

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра аналитической химии

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

**Изучение влияния гистидин-содержащих дипептидов на
свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата**

Дипломник:

Е. Н. Шендикова _____

Научный руководитель:

доктор химических наук,
профессор

И. Л. Юркова _____

Рецензент:

доктор химических наук,
профессор

С. М. Лещев _____

Допущена к защите

«___» _____ 2015 г.

Зав. кафедрой аналитической химии
доктор химических наук, профессор
Е.М. Рахманько

Минск, 2015

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 45 с., 16 рис., 1 табл., 67 источников.

ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДЫ, ГЛИЦЕРО-1-ФОСФАТ, АНТИОКСИДАНТЫ, ПЕПТИДЫ, КАРНОЗИН, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ЛИПИДОВ

Объекты исследования: глицеро-1-фосфат, гистидин-содержащие дипептиды.

Цель работы – изучить влияние гистидин-содержащих дипептидов на протекание свободнорадикальной фрагментации глицеро-1-фосфата.

Основными методами исследований являются спектрофотометрия, флуориметрия, методы и приемы радиационной химии и химии свободных радикалов, вычислительные методы.

В результате выполнения дипломной работы впервые установлено, что гистидин-содержащие дипептиды оказывают анти- или прооксидантное действие на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата в зависимости от способа инициирования процесса. Карнозин проявляет протекторные свойства в дозо-зависимой манере, независимо от вида индуктора. Данные по влиянию свободных β -аланина и L-гистидина на фрагментацию глицеро-1-фосфата указывают на важную роль дипептидной связи в защитных свойствах карнозина.

Полученные результаты необходимы для решения практических задач, связанных с разработкой перспективных пептидных антиоксидантов, созданием функциональных пищевых продуктов и эффективных фармацевтических препаратов для профилактики и лечения заболеваний, патогенез которых связан с действием свободных радикалов.

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние гистидин-содержащих дипептидов на деструкцию глицеро-1-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи. Установлено, что гистидин-содержащие дипептиды оказывают анти- или прооксидантное действие на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата в зависимости от способа инициирования процесса (редокс-системы или ионизирующее излучение). Карнозин проявляет протекторные свойства в дозозависимой манере, независимо от вида индуктора. Данные по влиянию свободных β -аланина и L-гистидина на фрагментацию глицеро-1-фосфата указывают на важную роль дипептидной связи в защитных свойствах карнозина.

РЭЗЮМЭ

Вивучаны ўплыў дыпептыдаў, якія змяшчаюць гістыдын, на дэструкцыю гліцэра-1-фасфата з разрывам фосфаэфірнай сувязі. Вызначана, што дыпептыды, якія змяшчаюць гістыдын, узмацняюць альбо інгібіруюць свабоднарадыкальную фрагментацыю гліцэра-1-фасфата ў залежнасці ад спосабу актывацыі працэса (рэдокс-сістэмы ці іянізуючае выпраменьванне). Карназін праяўляе пратэктарнае дзеянне, незалежна ад тыпу індуктара. Вынікі ўплыву свабодных β -аланіна і L-гістыдына на фрагментацыю гліцэра-1-фасфата паказваюць значную ролю дыпептыднай сувязі ў праяве ахоўных здольнасцей карназіна.

ABSTRACT

The influence of histidine-containing dipeptides on destruction of glycerol-1-phosphate with breaking of phosphoester bonds was studied. It has been established that the histidine-containing dipeptides have anti- or prooxidant effect on free-radical fragmentation process of the glycerol-1-phosphate depending on the method of initiation process (redox systems or ionizing radiation). Carnosine has protective properties regardless of the inductor. Data on the effect of free β -alanine and L-histidine on the fragmentation process of the glycerol-1-phosphate indicate an important role of the dipeptide bond in displaying of carnosine protective properties.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Образование и роль активных форм кислорода в биосистемах.....	9
1.2 Свободнорадикальная фрагментация биологически активных производных глицерина	11
1.2.1 Свободнорадикальная фрагментация глицерофосфолипидов	11
1.2.2 Свободнорадикальная фрагментация глицеро-1-фосфата	15
1.3 Антиоксидантные свойства карнозина и его производных.....	16
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	18
2.1 Исходные реагенты и материалы	18
2.2 Приготовление растворов	18
2.3 Методы инициирования свободнорадикальных процессов	18
2.3.1 Физическое инициирование с помощью γ -излучения	18
2.3.2 Химическое инициирование с помощью окислительно- восстановительных систем	19
2.4 Определение антирадикальных свойств гистидин-содержащих ди- пептидов и аминокислот с помощью флуоресцентного зонда	19
2.5 Анализ неорганического фосфата на фоне глицеро-1-фосфата.....	20
2.6 Математическая обработка результатов эксперимента	21
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.....	22
3.1 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на Fe^{2+} - опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата.....	22
3.2 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на Cu^{2+} - опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата.....	24
3.3 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на радиационно- инициированную фрагментацию глицеро-1-фосфата.....	27
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	40
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	45

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

Ала – аланин,
Анс – ансерин,
АО – антиоксидант,
АФК – активные формы кислорода,
Гис – гистидин,
Гли-Гис – глицил-гистидин,
ГСД – гистидин-содержащие дипептиды,
ГТФ – гидрокситерефталевая кислота,
ГФ – глицеро-1-фосфат,
ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин,
Кар – карнозин,
КЛ – кардиолипин,
Мет – метионин,
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты,
ПОЛ – пероксидное окисление липидов,
см. – смотри,
СРФЛ – свободнорадикальная фрагментация липидов,
Тир – тирозин,
Три – триптофан,
ТФ – терефталевая кислота,
ФГА – фосфатидилгидроксиацетон,
ФГ – фосфатидилглицерин,
ФК – фосфатидная кислота,
ФЛ – флуоресценци,
ФХ – фосфатидилхолин,
ФЭ – фосфатадилэтанолламин,
Цис – цистеин.

ВВЕДЕНИЕ

В развитии многих заболеваний (нейродегенеративные, аутоиммунные, иммунодефицитные, рак и др.) важную роль играют свободные радикалы [1-3]. В организме образование активных форм кислорода (АФК) или азота ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HOCl$, HO^{\cdot} , $^{\cdot}NO$, $^{\cdot}NO_2$, $ONOO^-$) контролируется сложной не/ферментативной системой антиоксидантной защиты [1-3], но при нарушении баланса оксиданты/антиоксиданты АФК приводят к повреждению компонентов клеток – липидов, белков, нуклеиновых кислот, углеводов [3-6]. В целом это определяет актуальность исследований свободнорадикальных механизмов повреждения биомолекул, с одной стороны, и поиска эффективных антиоксидантов для ингибирования таких повреждений, с другой.

Глицеро- и сфинголипиды являются важнейшими структурными компонентами биомембран и биоэффекторами, регулируемыми внутриклеточные реакции и межклеточное взаимодействие [7]. Липидный бислой выполняет роль матрицы для белковых, липопротеидных и гликопротеидных компонентов мембран, во многих клетках до 80% белков встроены в мембраны или связаны с их поверхностью. Повреждение химической структуры липидов будет приводить к нарушению их свойств и функций и, следовательно, жизнедеятельности клетки. При взаимодействии АФК с амфифильными молекулами глицеро- и сфинголипидов свободнорадикальные реакции могут протекать как в их гидрофобных, так и в гидрофильных частях [8]. Широко изучаемым свободнорадикальным процессом, реализующимся в гидрофобной части бислойной мембраны, является пероксидное окисление липидов (ПОЛ) [3, 6, 9, 10]. В результате ПОЛ происходит модификация гидрофобного фрагмента [3, 6], но при этом не изменяется гидрофильная часть, которая в клетке обращена в водную фазу, где и образуются активные АФК. В работах [11-17] показано, что свободнорадикальные процессы могут протекать в гидрофильной части липидной мембраны, а именно, реакция свободнорадикальной фрагментации через образование α -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов. Данный процесс приводит не только к деструкции глицеро- и сфинголипидов с разрывом эфирных, *O*-гликозидных и амидных связей в молекулах липидов, но и образованию глицеридов, глицерофосфатидов, церамидов и амидов жирных кислот, обладающих функциями вторичных мессенджеров в биосистемах. Для осуществления эффективного контроля АФК-опосредованных повреждений липидов необходимо искать пути

регулирования свободнорадикальных процессов как в неполярной, так и в полярной части липидных мембран.

В настоящее время для защиты организма от окислительного стресса применяют широкий спектр природных и синтетических экзогенных антиоксидантов, которые могут предотвращать образование или акцептировать образовавшиеся свободные радикалы [3]. Антиоксиданты, природные или выделенные из природных источников, находят все больше внимания у исследователей, так как обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими АО, включая отсутствие иммуногенности, аллергенности и более низкую токсичность [18]. К основным классам природных антиоксидантов наряду с каротиноидами, тиолами, фенольными соединениями относятся пептиды [18, 19]. В литературе описано большое количество антиоксидантных пептидов, выделенных из натуральных продуктов или полученных путем энзиматического гидролиза и/или микробиологической ферментации пищевых белков [20, 21]. Ряд эндогенных пептидов (глутатион, пептиды эпифиза, пептиды тимуса и др.) также вовлекается в регулирование окислительного стресса в биосистемах [18, 20, 23]. Одной из групп нативных пептидов, обладающих антиоксидантными свойствами, являются гистидин-содержащие пептиды, к которым относится карнозин и его производные [18, 24, 25]. Дипептид карнозин в организме человека представлен во многих органах (мозг, печень, глаза, желудок, почки, легочная ткань), но в высоких концентрациях содержится в скелетных мышцах (~ 20 мМ) и в обонятельных луковицах головного мозга (~ 2.5 мМ) [24, 25].

Механизм антиоксидантного действия биоактивных пептидов интенсивно исследуется, но до конца неясен [18]. Выявлено [21, 22], что наличие остатков редокс- активных аминокислот (Тир, Три, Мет, Цис, Гис) является важным структурным дескриптором антиоксидантных пептидов. Считают [18], что короткие пептиды (2-10 аминокислотных остатков) более эффективны как антиоксиданты, чем их исходные нативные белки и олигопептиды (10-15 аминокислотных остатков или больше), хотя в целом нет четкого понимания зависимости структура – активность [18]. В какой мере пептиды могут влиять на развитие свободнорадикальной фрагментации липидов (СРФЛ) в полярной части бислойной мембраны – не изучено.

Глицеро-1-фосфат (ГФ) является структурным фрагментом глицерофосфолипидов и при исследовании свободнорадикальных превращений последних может быть использован в качестве модельного соединения. Кроме того, ГФ представляет собой важный компонент клетки, участвующий не только в синтезе липидов, но и некоторых метаболических процессах [26].

Целью данной работы было изучение влияния гистидин-содержащих дипептидов (ГСД) на протекание свободнорадикальной фрагментации глицеро-1-фосфата.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- изучение влияния ГСД на свободнорадикальную фрагментацию ГФ, индуцированную γ -излучением или Fe^{2+} (Cu^{2+})-содержащими редокс-системами;
- изучение влияния кислорода на радиационно-иницированное дефосфорилирование ГФ в присутствии гистидин-содержащих дипептидов;
- исследование закономерностей свободнорадикальной фрагментации ГФ в присутствии β -аланина и гистидина.

ГЛАВА 1

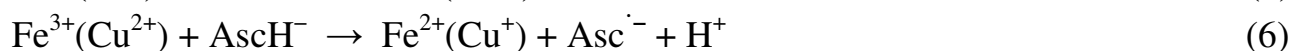
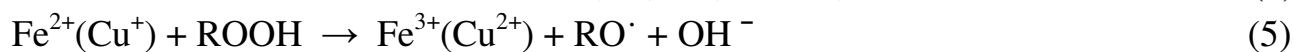
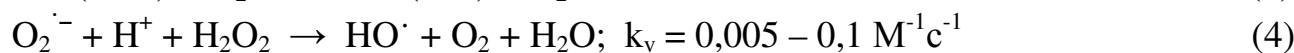
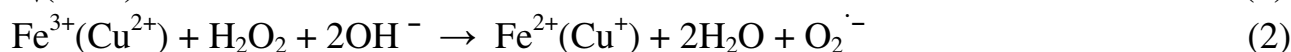
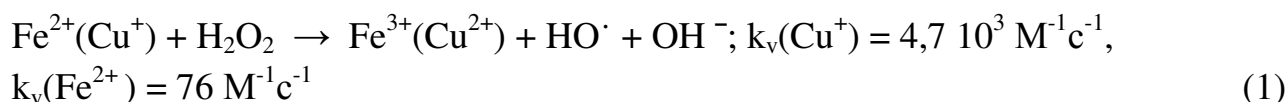
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Образование и роль активных форм кислорода в биосистемах

Образование АФК, способных индуцировать деструктивные процессы в организме, происходит за счет, как эндогенных (транспорт электронов в митохондриях и микросомах, ферментативные реакции, автоокисление), так и экзогенных источников (ксенобиотики, загрязнения окружающей среды, инфекционные агенты, смог, никотин, излучения и т. п.) [3]. Важную роль в формировании АФК в клетке играют редокс-активные металлы (медь, железо), которые могут накапливаться в организме человека в условиях развития окислительного стресса, обусловленного физико-химическими факторами окружающей среды [3, 27-28].

По реакции Фентона ионы Fe^{2+} и Cu^+ превращают слабый окислитель пероксид водорода в гидроксильный радикал ($\text{HO}\cdot$), одну из самых активных частиц в природе (см. реакции 1-3) [3, 29-31]. Частицы $\text{HO}\cdot$ являются также продуктами реакции Хабера-Вайса, встречающейся в биохимической литературе (см. реакцию 4). Однако ещё в 70-х гг. прошлого столетия показано, что скорость данной реакции крайне низкая ($k_v = 0,005 - 0,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), поэтому использовать её для объяснения возможного механизма токсичности кислорода считается не обоснованным [32]. Взаимодействие ионов переходных металлов с органическими пероксидами также приводит к образованию радикалов $\text{HO}\cdot$ (см. реакцию 5). Механизм реакции ионов металлов (M^{n+}) с пероксидами может быть более сложным, чем простой перенос электрона от ионов металла M^{n+} к H_2O_2 , как представлено на схеме реакции 1. Данная реакция может протекать через образование переходных комплексов $\text{M}-\text{H}_2\text{O}_2^{n+}$, которые, распадаясь, генерируют $\text{HO}\cdot$ радикалы, либо активные окислительные частицы, где металл проявляет необычные степени окисления; например, в случае железа (IV) - ферилл ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}$ или $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) и железа (V) - перферилл ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ или $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$). По всей видимости, формирование тех или иных активных частиц зависит от условий реакции (рН среды, наличие лигандов) [33]. Связанные в комплексные соединения, ионы переходных металлов часто проявляют большую активность. Например, ионы меди (II) менее активны, чем ионы железа (II), но связанные в аммиачные комплексы $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, они вызывают быстрое разложение H_2O_2 . В клетках ионы Fe^{3+} или Cu^{2+} превращаются в ионы Fe^{2+} или Cu^+ под действием восстановителей, таких как аскорбиновая кислота (AscH^-), что приводит к

следующему кругу образования гидроксильных радикалов (см. реакцию 6) [3, 31, 34].



Так, в биомембранах ионы переходных металлов могут катализировать образование активных форм кислорода, которые способны повреждать компоненты клетки, в том числе биологически активные производные глицерина. Поэтому важно исследовать превращения данных соединений в присутствии ионов $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ на модельных соединениях.

Источником образования активных частиц в клетке может быть также ионизирующее излучение. Действие ионизирующего (γ -радиация, рентгеновские лучи, α -частицы, электроны) излучения может индуцировать как прямое повреждение важных биологических веществ, так и усиленное образование АФК. Ионизирующее излучение передаёт энергию веществу за $10^{-16} - 10^{-13}$ с. В последующие $10^{-13} - 10^{-6}$ с происходит образование ионов, свободных радикалов, сольватированных электронов. Радикалы взаимодействуют с веществами, повреждая их, что приводит к инактивации или нарушению функций макромолекул в течение $10^{-6} - 10^{-3}$ с. Организм состоит на $\sim 75\%$ из воды, при γ -облучении воды образуются активные частицы ($\text{HO}\cdot$, $\text{H}\cdot$ и гидратированный электрон) с коротким временем жизни ($10^{-10} - 10^{-9}$ с), которые индуцируют реакции деструкции компонентов клетки, опосредуя косвенное действие излучения [35]. Долгое время считалось, что наиболее чувствительным компонентом клетки к действию ионизирующего излучения является клеточное ядро, в частности, содержащиеся в нём дезоксирибонуклеиновые кислоты. Впоследствии было установлено, что высокой радиочувствительностью обладает клеточная мембрана, состоящая, главным образом, из белков и липидов, что проявляется в нарушении её целостности и функций. Было также показано, что радиационно-инициируемые повреждения мембраны играют критическую роль в программируемой клеточной гибели.

Так, образование АФК в организме человека контролируется антиоксидантной системой. Сбалансированность процессов формирования АФК и их дезактивации посредством системы защиты может нарушаться под

воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов, что в результате приводит к повреждению важнейших компонентов клеток и, как следствие, нарушению функций последних [35].

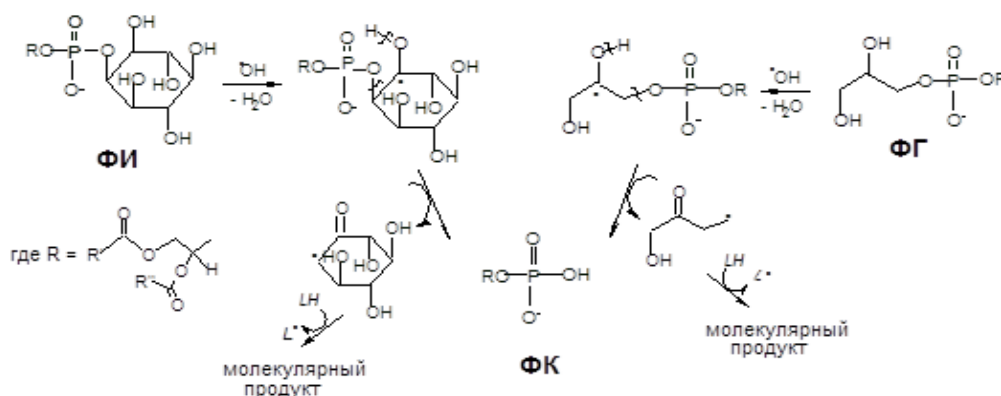
1.2 Свободнорадикальная фрагментация биологически активных производных глицерина

1.2.1 Свободнорадикальная фрагментация глицерофосфолипидов

Глицерофосфолипиды – фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), дифосфатидилглицерин (кардиолипин (КЛ)) – различаются остатками спирта в полярных фрагментах.

При изучении свободнорадикальных превращений глицерофосфолипидов методом стационарного радиолита установлено, что ФИ и ФГ, содержащие остатки полиолов в гидрофильной части, подвергаются деструкции с образованием фосфатидной кислоты (ФК). Разрыв фосфоэфирной связи в молекулах липидов ФИ и ФГ и, как следствие, образование продукта ФК – результат реализации в их полярной части реакции свободнорадикальной фрагментации (см. схему 1). Сущность процесса заключается в том, что при взаимодействии радикалов $\text{HO}\cdot$, продуктов радиолита воды ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{H} + e_{\text{aq}}^-$) с гидрофильной частью глицерофосфолипидов образуются α -гидроксилсодержащие углеродцентрированные радикалы с неспаренным электроном в β -положении к фосфоэфирной связи $-\text{OCH}_2-\text{C}\cdot(\text{OH})-\text{CH}_2-$. Эти радикалы распадаются с разрывом двух связей в β -положениях по отношению к радикальному центру с образованием молекулярного продукта и радикального интермедиата. Образование ФК – один из основных процессов радиолита исследованных липидов, так как величины её радиационно-химических выходов (G) составляют $\sim 50 - 70\%$ от выхода радикалов $\text{HO}\cdot$ ($G_{\text{OH}} = 2,8 \cdot 10^{-7}$ моль Дж $^{-1}$) [8].

Схема 1

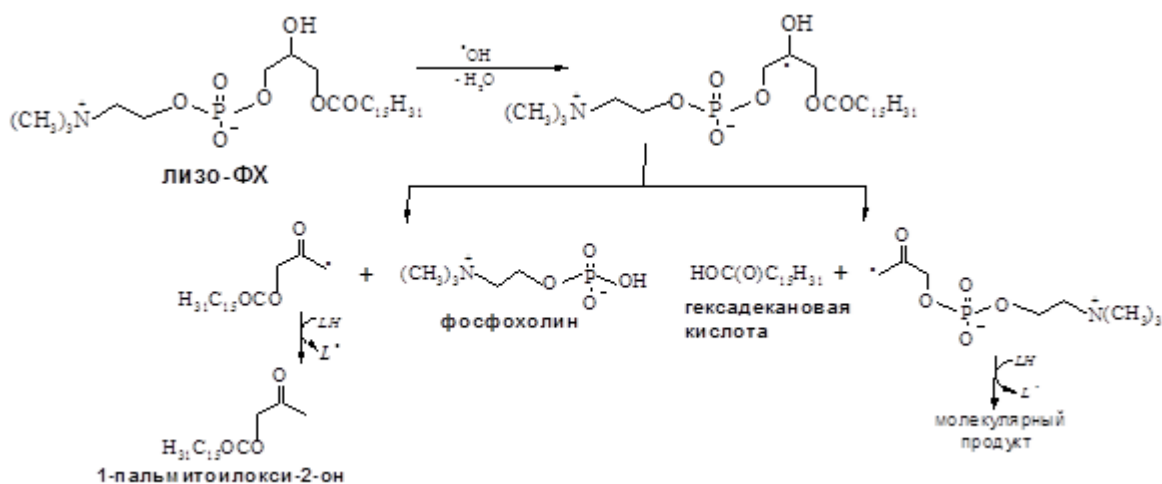


Фосфатидилхолин отличается от ФИ и ФГ тем, что в гидрофильной части содержится остаток аминок спирта (холина) и отсутствуют гидроксильные группы. ФХ оказался более устойчивым к процессу свободнорадикальной деструкции с разрывом эфирных связей в молекуле, чем ФГ и ФИ. Методом стационарного радиолиза установлено, что ФХ не подвергается распаду с образованием диацилглицерина и свободных жирных кислот. Данные вещества не накапливались и при радиационно-инициированных превращениях ФГ. Отличие свободнорадикальных превращений ФХ от реакций с участием ФГ состояло в том, что среди продуктов γ -радиолиза водных суспензий ФХ не была определена фосфатидная кислота. Действие на ФХ-липосомы окислительно-восстановительных систем ($\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+}) - \text{H}_2\text{O}_2$ или $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+}) - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{аскорбат}$), способных генерировать радикалы HO^\bullet , также не приводили к образованию ФК, которая накапливалась при превращениях фосфатидилглицеринов в идентичных условиях [8].

Влияние строения полярной части глицерофосфолипидов на их склонность к фрагментации при действии инициаторов свободнорадикальных реакций на модельные мембраны хорошо прослеживается из сравнения данных, полученных для 1,2-дигексадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (1,2-дипальмитоилфосфатидилхолина, ДПФХ) и 1-гексадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (лизо-ФХ) [8].

Так, при взаимодействии частиц HO^\bullet с полярной частью лизо-ФХ (см. схему 2) образуются α -гидроксилсодержащие углеродцентрированные радикалы.

Схема 2



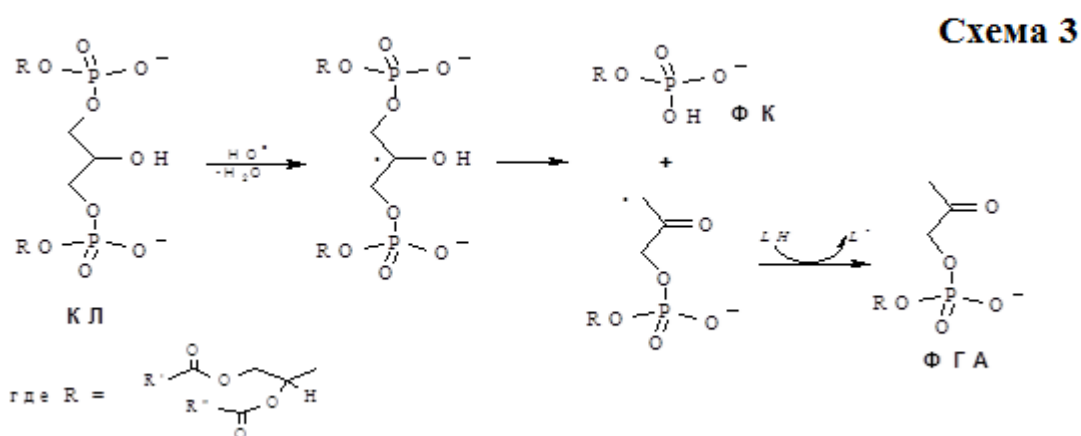
Их фрагментация с разрывом двух β -связей приводит, в зависимости от направления распада, к фосфохолину и радикальному интермедиату, который восстанавливается до 1-пальмитоилокси-2-она либо к гексадекановой кислоте. Радикалы ($-\text{OCH}_2-\text{C}^\bullet(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}_{15}\text{H}_{31}$) более склонны к распаду с

разрывом фосфоэфирной, а не сложноэфирной связи, поскольку выход фосфохолина в 3 раза больше, чем выход кислоты. Константа скорости (k_v) элиминирования фосфохолина из радикалов ($-\text{OCH}_2-\text{C}^*(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}_{15}\text{H}_{31}$), генерированных селективно, равна $3,5 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$, а гексадекановой кислоты – $k_v = 3,8 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$ [8].

Свободнорадикальные превращения ДПФХ не приводили к образованию фосфохолина и гексадекановой кислоты. Эти результаты указывают на то, что наличие свободной OH-группы в β -положении к (фосфо)эфирной связи в молекуле глицерофосфолипида определяет его способность к свободнорадикальной фрагментации.

К глицерофосфолипидам, содержащим свободную OH-группу в полярной части, относится и кардиолипин. Этот уникальный липид с димерной структурой составляет ~25 % от всех липидов митохондриальной мембраны [8, 36]. Митохондрии являются основным источником АФК в клетке. Среди митохондриальных компонентов КЛ представляется наиболее чувствительным липидом к атаке АФК, так как локализуется на внутренней мембране вблизи мест их генерирования. Его содержание резко уменьшается при развитии АФК-опосредованного окислительного стресса [8].

В работах [11-17] показано, что гидрофильная часть КЛ подвергается свободнорадикальной фрагментации. В результате происходит его деструкция с разрывом фосфоэфирной связи и образованием молекулярного продукта – фосфатидной кислоты – и радикального интермедиата, который восстанавливается до фосфатидилгидроксиацетона (ФГА) (см. схему 3). ФГА не является нативным липидом и может служить маркером процесса.



Процесс ПОЛ зависит от наличия молекулярного кислорода в системе. Количество гидропероксидов, образующихся в результате радиационно-иницированного ПОЛ в фосфолипидной мембране, снижается с уменьшением концентрации кислорода [8]. Изменение концентрации кислорода влияет и на

свободнорадикальную фрагментацию глицерофосфолипидов, но это влияние имеет другой характер. Насыщение кислородом водных дисперсий 1,2-дитетрадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*sn*-глицерина) и 1',3'-бис-(1,2-дитетрадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-*sn*-глицерина приводит к двукратному уменьшению выхода продуктов радиационно-инициированной фрагментации данных липидов по сравнению с дезаэрированными средами. α -Гидроксилсодержащие углеродцентрированные радикалы, которые образуются в полярной части данных липидов, взаимодействуют с кислородом и этот процесс конкурирует с реакцией их фрагментации [8]. Насыщение кислородом водных суспензий глицерофосфолипидов приводит к снижению выхода продуктов фрагментации, но не к полному подавлению процесса. Это указывает на то, что распад образующихся в полярной части радикалов $R^1OCH_2C^*(OH)CH_2(OR^2)$ с разрывом фосфоэфирной связи протекает в водных растворах с достаточной скоростью даже в присутствии кислорода [8, 37]. Ингибирующее влияние молекулярного кислорода на свободнорадикальную фрагментацию проявляется в меньшей степени для глицерофосфолипидов, содержащих остатки ПНЖК. Вероятно, это является следствием конкуренции между реакцией фрагментации и процессом пероксидного окисления, на реализацию которого расходуется кислород.

При действии АФК на модельные мембраны, включающие гидроксилсодержащие фосфолипиды, в гидрофобном слое реализуется процесс пероксидного окисления, а в гидрофильном - реакция свободнорадикальной фрагментации. ФГ, включающий остатки ПНЖК, подвергается как окислению, так и фрагментации [8].

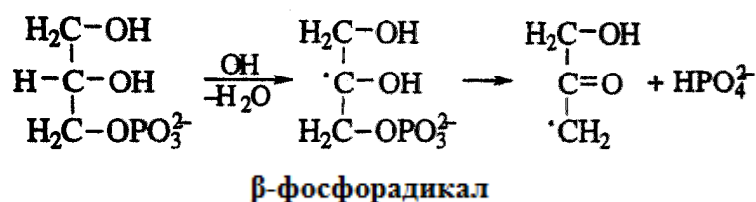
Следствием свободнорадикальной фрагментации является не только деструкция молекул глицерофосфолипидов, которые в биосистемах, помимо выполнения структурообразующей роли, вовлечены в регуляцию сигнальных процессов. В результате фрагментации образуется также фосфатидная кислота, являющаяся важнейшим вторичным мессенджером, который участвует в регуляции клеточной пролиферации, дифференциации и апоптоза. Кроме того, образующиеся в ходе фрагментации промежуточные радикальные интермедиаты могут инициировать дальнейшие свободнорадикальные процессы [8, 37].

1.2.2 Свободнорадикальная фрагментация глицеро-1-фосфата

Глицеро-1-фосфат является основой глицерофосфолипидов и при исследовании свободнорадикальных превращений последних может быть использован в качестве модельного соединения. Кроме того ГФ способен участвовать в метаболизме липидов и в различных гликолитических превращениях [26].

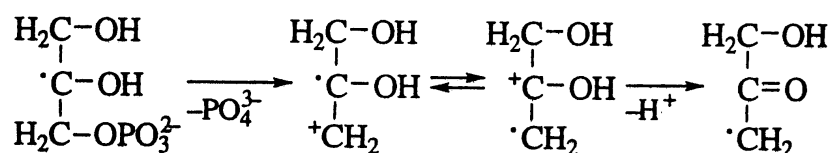
При взаимодействии радикалов $\text{HO}\cdot$ с ГФ реализуется процесс фрагментации, который приводит к разрыву фосфоэфирной связи в молекулах субстрата и образованию неорганического фосфата и радикала гидроксиацетона, как показано на схеме 4 [38]. Радикал гидроксиацетона может отрывать H-атом и восстанавливаться до гидроксиацетона.

Схема 4



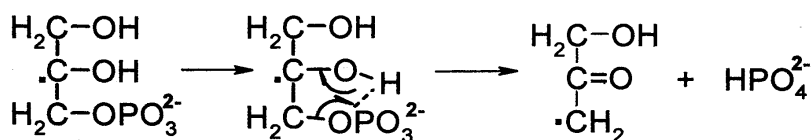
Существуют две точки зрения по поводу механизма фрагментации β -фосфорорадикалов ГФ с разрывом двух β -связей. Согласно представлениям о гетеролитической фрагментации [39], распад данных радикалов происходит в соответствии со схемой 5:

Схема 5



Другая точка зрения основывается на том, что реакции такого типа протекают согласованно через пятичленное переходное состояние (см. схему б), которое реализуется при наличии в функциональных группах исходных молекул атомов водорода:

Схема б



Известно[39], что протеканию реакции по гетеролитическому механизму способствует наличие в системе ионов водорода. Следовательно, в кислой

среде вероятность распада радикалов за счёт гетеролитического разрыва должна возрастать. Однако в работе [38] показано, что изменение pH среды практически не влияет на радиационно-химический выход фосфата при радиолизе ГФ в водных растворах, что свидетельствует в пользу согласованного механизма фрагментации радикалов ГФ.

1.3 Антиоксидантные свойства карнозина и его производных

Карнозин является эндогенно синтезируемым дипептидом, который широко распространён во многих тканях, достигая наивысшей концентрации в скелетных мышцах (~ 20 мМ) и в обонятельных луковицах головного мозга (~ 2.5 мМ) [40]. Он был впервые выделен из экстракта мясного фарша (В. С. Гулевич 1900 г.), а затем идентифицирован как β-аланил-L-гистидин (рисунок 1) [41, 42].

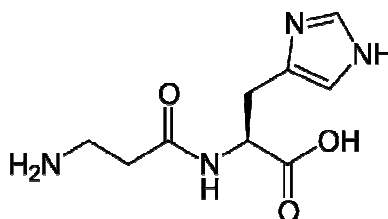


Рисунок 1 – Структурная формула карнозина

С тех пор, различные структурные производные карнозина, такие как ансерин (β-аланил-метилгистидин), гомокарнозин (γ-амино-бутирил-гистидин) и другие, были выделены из возбудимых тканей [42]. Ансерин не содержится в теле человека; впервые его идентифицировали при изучении мышечной ткани птиц (гусей и кур).

Результаты многочисленных исследований показывают, что карнозин *in vivo* синтезируется при взаимодействии входящих в его состав аминокислот. Образование пептидной связи между гистидином и β-аланином протекает под действием фермента карнозинсинтетазы при обязательном участии ионов Mg²⁺ и АТФ. При замене β-аланина (или гистидина) другими аминокислотами (или их производными) с помощью синтетазы был получен целый ряд дипептидов, в том числе осуществлена конденсация β-аланина с метилгистидином [41].

Карнозин, как поступающий с пищей, так и содержащийся в тканях, может служить источником гистидина и β-аланина в организме. Гистидин представляет собой важнейшую аминокислоту, необходимую для синтеза белка. β-аланин – АК, которая входит в состав коэнзима А, а также является продуктом метаболизма пиримидиновых оснований [42] и оказывается

стимулятором образования коллагена, принимающего участие в репарации поврежденных тканей [41]. В организме человека реакция гидролиза карнозина катализируется двумя изоферментами: тканевой (цитозольной) карнозиной и сывороточной карнозиной. Они существенно различаются по субстратной специфичности, активации ионами металлов, молекулярной массе и т.д.

Несколько десятилетий, следовавших за открытием карнозина, характеризовались исследованием его возможной физиологической роли. Так было выявлено, что карнозин обладает ранозаживляющими, мембранопротекторными, иммуномодулирующими, радиопротекторными и антиоксидантными свойствами [41].

Антиоксидантная активность карнозина и его производных на протяжении многих лет изучалась *in vitro* и *in vivo* при различных способах генерирования свободных радикалов. Исследования на модельных системах показали, что ГСД способны подавлять пероксидное окисление мембранных липидов, вызванное как ферментативным, так и неферментативным путём [41, 42]. Это привело к предположению, что ГСД являются водорастворимыми аналогами жирорастворимых антиоксидантов (таких как α -токоферол), которые эффективно защищают клеточные мембраны от окислительных повреждений [42].

ГСД в отличие от большинства биологических антиоксидантов, оказывающих свое действие по одному типу защиты, проявляют несколько антиоксидантных свойств. Они могут не только акцептировать АФК, но и хелатировать ионы металлов, которые катализируют образование активных частиц [24, 43]. Карнозин, в частности, проявляет протекторное действие в случае Cu^{2+} -опосредованного генерирования свободных радикалов в большей степени, в сравнении с Fe^{2+} -инициированным процессом [24]. Ансерин обладает выраженной способностью подавлять миелопероксидазную реакцию, которая имеет решающее значение для характера протекания окислительного стресса в мышечной ткани [41].

Таким образом, деструкция глицерофосфолипидов и глицеро-1-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи является важным процессом при их взаимодействии с АФК. Влияние природных антиоксидантов на протекание данного процесса мало изучено. Действие карнозина и его производных на свободнорадикальную фрагментацию ГФ ранее не исследовано.

ГЛАВА 2

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Исходные реагенты и материалы

В работе использовали глицеро-1-фосфат динатриевая соль, β -аланин, L-гистидин, L-карнозин (β -аланил-L-гистидин), L-ансерин (β -аланил-3-метил-L-гистидин), глицил-гистидин, моноватриевая соль 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисульфокислоты (феррозин), терефталевая кислота от фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия). Маннитол, азид натрия, аскорбиновая кислота, калия дигидрофосфат, гидропероксид, соли металлов ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ или $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) были получены от ЗАО «Вектон» России.

Все использованные в работе реактивы и растворители имели аналитическую степень чистоты и использовались без предварительной очистки.

2.2 Приготовление растворов

Водные растворы аминокислот, дипептидов, гидропероксида, солей металлов, маннитола, азиды натрия, феррозина готовили на деионизированной воде или бидистилляте, полученном при перегонке дистиллята с марганцевокислым калием и гидроксидом натрия. Необходимая величина pH достигалась прибавлением растворов хлорной кислоты или гидроксида натрия, величину pH измеряли на милливольтметре pH HI 9321, используя комбинированный электрод HI 1131 или HI 1083.

Для приготовления дезаэрированных или насыщенных кислородом образцов водные растворы глицеро-1-фосфата с добавками/без добавок, помещенные в стеклянные ампулы, продували аргоном (99,9 %) в течение 60 мин или кислородом (99,9 %) в течение 30 мин, затем ампулы запаивали.

2.3 Методы иницирования свободнорадикальных процессов

1.3.1 Физическое иницирование с помощью γ -излучения

Исследуемые растворы, предварительно дезаэрированные или насыщенные кислородом, как описано выше, в герметично запаиваемых ампулах облучали на γ -установке МРХ-гамма-25М с источником излучения ^{60}Co . Стекло

для ампул предварительно промывали хромовой смесью, струёй водопроводной воды, дистиллятом, после чего высушивали в сушильном шкафу при температуре (180-200) °С. Для определения мощности поглощенной дозы использовали ферросульфатный дозиметр Фрике ($G(\text{Fe}^{3+}) = 15,5$ частица/100 эВ). Мощность поглощенной дозы установки составляла $(0,25 \pm 0,01)$ Гр/с, интервал поглощенных доз составлял $(0 \div 2,5)$ кГр. Облучение образцов проводили при комнатной температуре (20 ± 2) °С.

1.3.2 Химическое иницирование с помощью окислительно-восстановительных систем

Проведение химического иницирования с помощью редокс-систем $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ или $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ было выполнено следующим образом. К аликвотам водных растворов ГФ или суспензий липидов добавляли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ или $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 и аскорбиновую кислоту в количествах, необходимых для получения нужной концентрации каждого. Затем образцы тщательно перемешивали с использованием прибора «Vortex mixer» и термостатировали при температуре 37 °С в течение заданного времени. Контрольные образцы, не содержащие компонентов редокс-систем, термостатировали аналогичным образом.

Тестируемые вещества, влияние которых исследовали на свободнорадикальную фрагментацию фосфопроизводных глицерина, вводили в раствор субстрата до добавления компонентов редокс-систем.

1.4 Определение антирадикальных свойств ГСД и аминокислот с помощью флуоресцентного зонда

Метод флуоресцентных зондов базируется на том, что взаимодействие АФК с определенными органическими веществами приводит либо к снижению их собственной флуоресценции, либо к образованию флуоресцирующих продуктов [44].

ТФ является специфичным и высокочувствительным детектором частиц $\text{HO}^\cdot (< 0,5 \text{ пикоМ})$. ТФ реагирует с HO^\cdot ($k_v = 4,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) с образованием только одного моно-гидроксилированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ), обладающего стабильной флуоресценцией ($\lambda_{\text{воз}} = 315 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 427 \text{ нм}$). Радикалы HO^\cdot генерировали с помощью редокс-системы $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Снимали спектры флуоресценции в диапазоне 350–540 нм на спектрофлуориметре «Solar CM2203».

Процедура детектирования 2-НО-ТФ в редокс-системе без добавок и в присутствии тестируемых веществ была следующая.

- Готовили контрольную систему общим объемом 1000 мкл: к раствору 10 мМ ТФ (100 мкл) добавляли компоненты редокс-системы (10 мкл 100 мМ раствора H_2O_2 , 10 мкл 10 мМ раствора CuSO_4) и доводили до общего объема фосфатным буфером (рН 7,4).
- Готовили исследуемые системы общим объемом 1000 мкл: к раствору 10 мМ ТФ (100 мкл) добавляли аликвоту стандартного раствора тестируемого вещества, вводили компоненты редокс-системы (10 мкл 100 мМ раствора H_2O_2 , 10 мкл 10 мМ раствора CuSO_4) и доводили до общего объема фосфатным буфером (рН 7,4). При этом конечная концентрация добавки составляла 2 мМ во всех случаях.
- Полученные системы инкубировали при комнатной температуре в течение 22 мин. и измеряли флуоресценцию при 427 нм.

Антирадикальные свойства тестируемых веществ оценивали по их способности конкурировать с ТФ за взаимодействие с $\text{HO}\cdot$, что препятствует образованию флуоресцирующего продукта – 2-ГТФ. Так, степень уменьшения флуоресценции в присутствии тестируемых соединений в сравнении с контролем (ТФ + компоненты редокс-системы) является мерой оценки их защитных свойств.

1.5 Анализ неорганического фосфата в растворах глицеро-1-фосфата

Фосфат-анион определяли колориметрически по модифицированной методике, изложенной в работе [45]. В основе анализа использована цветная реакция фосфат-аниона с молибдатом аммония. Процедура анализа была следующая: к 0,2 мл исследуемой пробы добавляли 2 мл воды, 1 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (1,8 % раствор в 4 М H_2SO_4) и 0,2 мл раствора FeSO_4 (10 % раствор в 0,3 М H_2SO_4); полученный раствор фотометрировался относительно холостой пробы при длине волны, равной 720 нм. Концентрацию фосфат-аниона, как продукта свободнорадикальных превращений ГФ, рассчитывали по калибровочной кривой (рисунок 2). Для приготовления калибровочных растворов использовали однозамещенный фосфат калия марки «осч», высушенный до постоянного веса при температуре 110 °С, диапазон концентраций растворов был 0 – 2,5 мМ. Навески последнего растворяли в 0,1

М растворе глицеро-1-фосфата, содержащего добавки аминокислот или дипептидов.

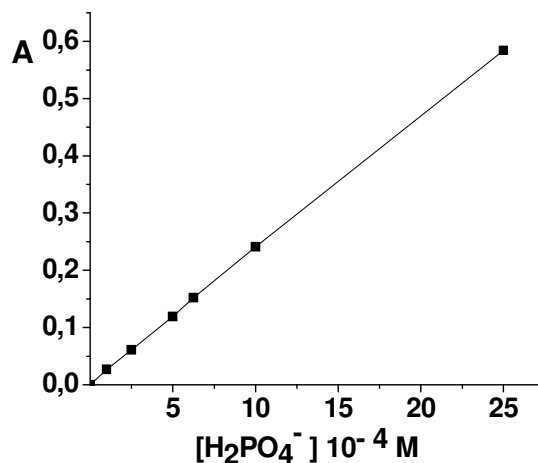


Рисунок 2 – Калибровочный график

1.6 Математическая обработка результатов эксперимента

Радиационно-химические выходы продуктов радиолиза определяли из данных по накоплению продуктов в зависимости от величины поглощенной дозы, используя компьютерную систему “Qbasic”. Радиационно-химические выходы рассчитывали как тангенс угла наклона зависимости концентрации продукта от поглощенной дозы на линейном участке кривой методом наименьших квадратов.

Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая встроенные в компьютер статистические функции программы «Excel» и «Origin». Достоверность полученных результатов контролировали с помощью t-теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3-5 раз параллельных опытов. В таблицах и на рисунках каждый результат представлен как среднее значение \pm SD, статистически отличное в сравнении с контролем ($P < 0,05$).

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на Fe^{2+} -опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата

Свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата (ГФ), ведущую к деструкции молекулы с разрывом фосфоэфирной связи, оценивали по образованию неорганического фосфата. Свободнорадикальное дефосфорилирование ГФ в водных растворах индуцировали металл-содержащими редокс-системами: $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ или $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$. Из данных, представленных на рисунке 3, следует, что акцепторы активных частиц (маннит, азид натрия, феррозин) эффективно ингибируют Fe^{2+} (Cu^{2+})-опосредованное дефосфорилирование ГФ.

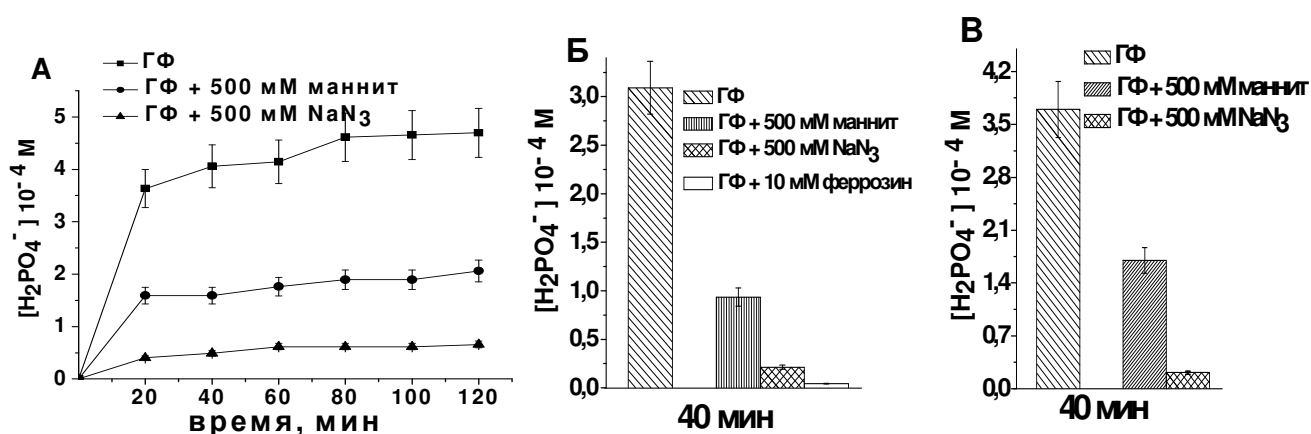


Рисунок 3 – Влияние маннита (500 мМ), азид натрия (500 мМ), феррозина (10 мМ) на дефосфорилирование ГФ (100 мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с А, Б - $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ (1/10/1 мМ), В - $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ (0,5/10/0,5 мМ)

На рисунке 4 представлены зависимости накопления неорганического фосфата от времени инкубирования водных растворов ГФ с системой $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ и добавками гистидин-содержащих дипептидов.

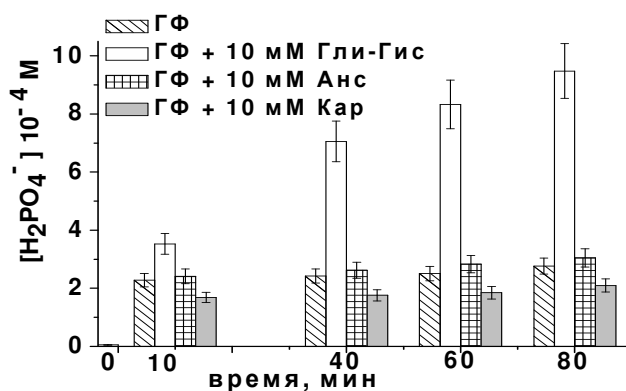


Рисунок 4 – Влияние карнозина (10 мМ), ансерина (10 мМ), глицил-гистидина (10 мМ) на дефосфорилирование ГФ (100мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с Fe²⁺/H₂O₂/аскорбат (0,5/10/1 мМ)

Из рисунка 4 следует, что введение гистидин-содержащих дипептидов (карнозина, ансерина или глицил-гистидина) в раствор ГФ не однозначным образом влияет на Fe²⁺-опосредованное дефосфорилирование ГФ. Деструкция ГФ резко усиливается в присутствии глицил-гистидина (Гли-Гис), на что указывает увеличение концентрации H₂PO₄⁻ в 3 раза в сравнении с контрольным образцом. Введение ансерина (Анс) в раствор ГФ не влияет существенно на образование фосфат-аниона. В то же время карнозин (Кар) снижает скорость дефосфорилирования ГФ, в его присутствии концентрация H₂PO₄⁻ снижается в 1,4 раза.

Выбор концентрации дипептидов в системах определялся их содержанием в живых организмах. Согласно данным, представленным на рисунках 5 и 6, в изученном диапазоне концентраций (0,5 ÷ 10) мМ Кар снижал количество фосфат-аниона значимым образом, начиная с концентрации 5 мМ.

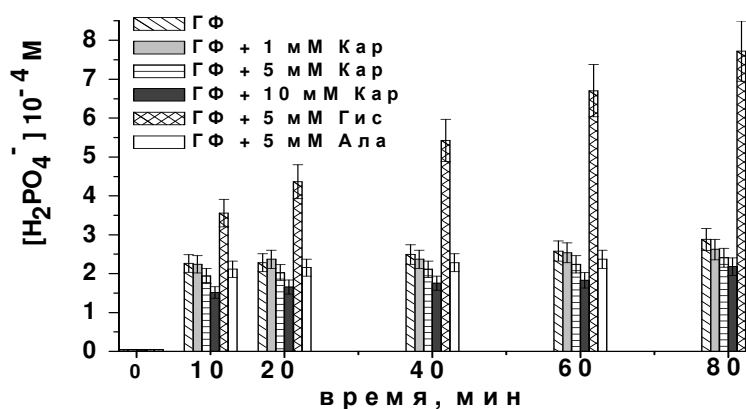


Рисунок 5 – Влияние карнозина, гистидина и β-аланина на дефосфорилирование ГФ (100 мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с Fe²⁺/H₂O₂/аскорбат (0,5/10/1 мМ)

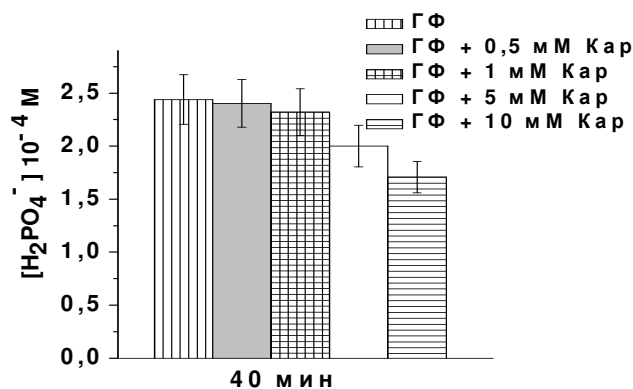


Рисунок 6 – Влияние карнозина на дефосфорилирование ГФ (100мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с Fe²⁺/H₂O₂/аскорбат (0,5/10/1мМ) в течение 40 мин

Карнозин – дипептид, состоящий из остатков β-аланина и L-гистидина. Как следует из рисунка 6, влияние свободных аминокислот на Fe²⁺-опосредованную фрагментацию ГФ в количествах, равных количеству Кар, отличается от действия последнего. β-Аланин (Ала) оказывает более слабый протекторный эффект на процесс в сравнении с Кар, а гистидин (Гис) значительно ускоряет фрагментацию ГФ, увеличивая концентрацию H₂PO₄⁻ в 2,5 раза в сравнении с контрольным образцом.

Так, из исследованных гистидин-содержащих дипептидов карнозин ингибирует Fe²⁺ - опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата, снижая уровень фосфат-аниона в 1,4 раза. Глицил-гистидин оказывает значительное активирующее (в 3 раза) действие на процесс, в то время как ансерин не проявляет значительных про- или антиоксидантных свойств.

2.2 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на Cu²⁺-опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата

Влияние гистидин-содержащих дипептидов на свободнорадикальную фрагментацию ГФ, индуцированную системой Cu²⁺/H₂O₂/аскорбат, как следует из рисунка 7, имеет совсем иную картину в сравнение с Fe²⁺ - опосредованным процессом. В данном случае все дипептиды ингибируют процесс дефосфорилирования ГФ. Карнозин снижал уровень фосфат-аниона в 2,5 раз. Дипептиды Анс и Гли-Гис были более эффективны, чем Кар, и фактически полностью подавляли фрагментацию ГФ.

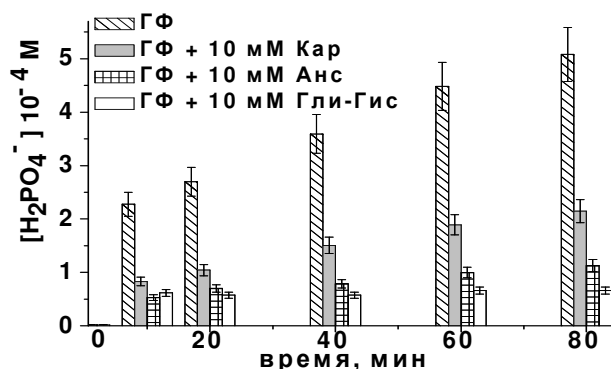


Рисунок 7 – Влияние карнозина (10 мМ), ансерина (10 мМ), глицил-гистидина (10 мМ) на дефосфорилирование ГФ (100 мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ (0,5/10/0,5 мМ)

Карнозин ингибировал Cu^{2+} - опосредованную фрагментацию ГФ в дозозависимой манере согласно данным, представленным на рисунках 8 и 9. Антиоксидантный эффект дипептида проявлялся во всем исследованном диапазоне концентраций (0,5-10 мМ) и усиливался с увеличением его количества в растворе.

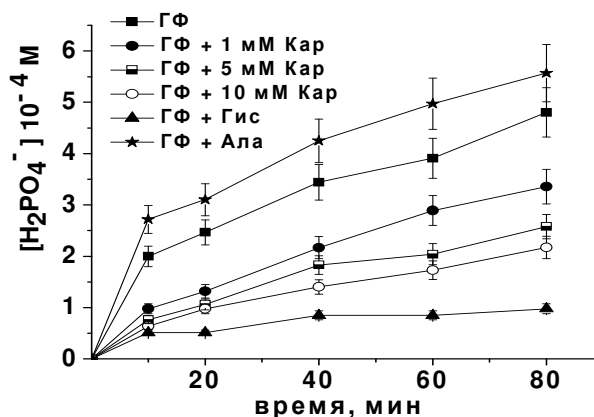


Рисунок 8 – Влияние карнозина, гистидина (5 мМ) и аланина (5 мМ) на дефосфорилирование ГФ (100 мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{аскорбат}$ (0,5/10/0,5 мМ)

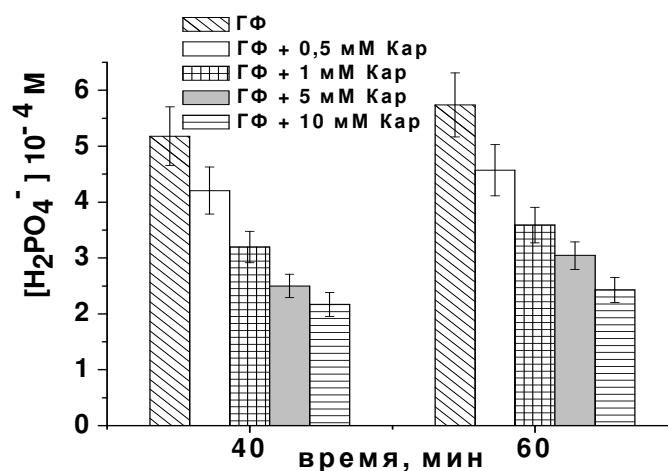


Рисунок 9 – Влияние карнозина на дефосфорилирование ГФ (100мМ) в водном растворе, инкубированном при 37 °С с Cu²⁺/H₂O₂/аскорбат (0,5/10/1 мМ)

Как следует из рисунка 5, влияние свободных аминокислот на Cu²⁺-опосредованную фрагментацию ГФ в количествах, равных количеству Кар, отличается от действия последнего. β-Аланин в сравнении с Кар активирует фрагментацию ГФ, повышая концентрацию фосфат-аниона в 1,2 раза. В то же время гистидин проявляет значительное протекторное действие на процесс деструкции ГФ, снижая концентрацию H₂PO₄⁻ в ~ 5 раз в сравнении с контрольным образцом.

На рисунке 10 представлены результаты исследования антирадикальных свойств ГСД и аминокислот, их составляющих.

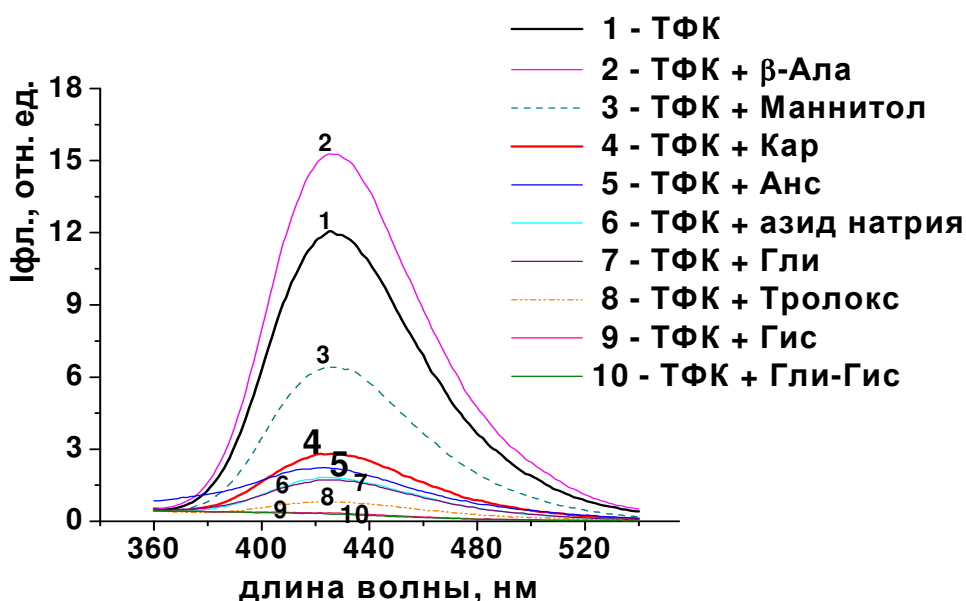


Рисунок 10 – Спектры флуоресценции 2-ГТФ в присутствии различных тестируемых соединений (2 мМ). Инициатор – Cu²⁺/H₂O₂

Из рисунка 10 следует, что в условиях Cu^{2+} -катализируемого генерирования частиц $\text{HO}\cdot$ наибольший антиоксидантный эффект проявлял Гли-Гис, который снижал интенсивность флуоресценции (ФЛ) в ~ 41 раз, а Кар и Анс только в ~ 4 и 5 раз, соответственно. Действие ГСД сравнивали с влиянием азида натрия, эффективного акцептора $\text{HO}\cdot$, NaN_3 подавлял ФЛ в $6,6$ раз. Свободные аминокислоты по их эффекту располагались в следующий ряд: аланин (усиливал ФЛ в $1,3$ раза), глицин (снижал ФЛ в 7 раз), гистидин (снижал ФЛ в 34 раза).

Так, все исследованные гистидин-содержащие дипептиды эффективно ингибируют Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата. При этом глицил-гистидин и ансерин эффективнее, чем карнозин, подавляют указанный процесс.

2.3 Влияние гистидин-содержащих дипептидов на радиационно-иницированную свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата

На рисунке 11 представлены кривые накопления неорганического фосфата от поглощенной дозы при действии γ -излучения на дезаэрированные водные растворы ГФ с и без добавок ГСД. Во всех исследованных системах количество H_2PO_4^- увеличивается линейно с поглощенной дозой в используемом интервале доз ($0 \div 2,5$) кГр. Радиационно-химический выход H_2PO_4^- в растворе ГФ без добавок составил $G = (3,58 \pm 0,30)$ молекула/100 эВ. При введении в раствор ГФ гистидин-содержащих дипептидов в концентрации, равной $0,01$ моль/л, выход H_2PO_4^- снижается до величины $(2,29 \pm 0,27)$, $(2,04 \pm 0,15)$ и $(1,88 \pm 0,21)$ молекула/100 эВ для Гли-Гис, Кар и Анс, соответственно.

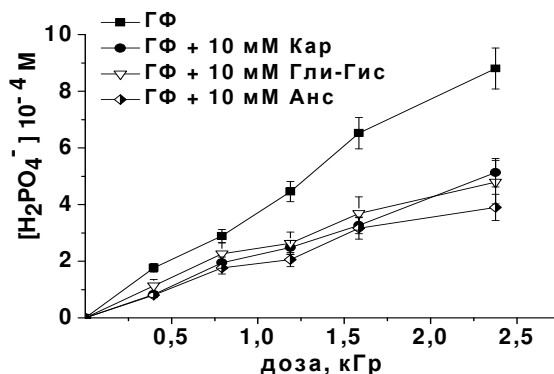


Рисунок 11 – Зависимость накопления H_2PO_4^- от поглощенной дозы при γ -облучении дезаэрированного водного $0,1$ моль/л раствора ГФ в присутствии глицил-гистидина, карнозина, ансерина

Карнозин ингибировал радиационно-иницированную фрагментацию ГФ в концентрационно-зависимой манере согласно данным, представленным на рисунке 12.

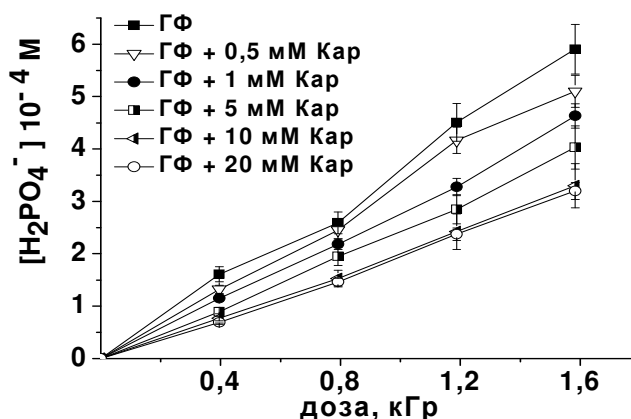


Рисунок 12 –Зависимость накопление H_2PO_4^- от поглощённой дозы при γ -облучении дезаэрированного водного 0,1 моль/л раствора ГФ в присутствии карнозина

С увеличением концентрации дипептида его радиопротекторный эффект усиливается, что сопровождается снижением радиационно-химического выхода фосфат-аниона в системе согласно данным, представленным в нижеследующей таблице 1.

Таблица 1 – Радиационно-химический выход H_2PO_4^- при γ -облучении дезаэрированного водного 0,1 моль/л раствора ГФ в присутствии карнозина

Концентрация карнозина, mM	G (H_2PO_4^-), молекула/100 эВ
0	$3,57 \pm 0,24$
0,5	$3,18 \pm 0,20$
1	$2,75 \pm 0,11$
5	$2,39 \pm 0,10$
10	$1,97 \pm 0,07$
20	$1,91 \pm 0,10$

На рисунке 13 представлены зависимости накопления фосфат-аниона от поглощенной дозы при γ -радиолизе водных растворов ГФ, насыщенных кислородом. Радиационно-химический выход H_2PO_4^- в системе без добавок

составил $G = (1,94 \pm 0,14)$ молекула/100 эВ, он был рассчитан на начальном прямолинейном участке дозной кривой. Интервал используемых доз составил 0 – 2,5 кГр. Радиационно-химический выход фосфат-аниона при γ -радиолизе ГФ в присутствии Кар, Анс и Гли-Гис на прямолинейных участках кинетических кривых «доза-концентрация» составил $(1,88 \pm 0,14)$, $(1,75 \pm 0,20)$ и $(1,92 \pm 0,16)$ молекула/100 эВ, соответственно. Фосфат-анион в контроле и образцах с добавками ГСД накапливается в приблизительно равных количествах в диапазоне доз (0-1,25) кГр, однако начиная с дозы 1,25 кГр, когда в системах уменьшается концентрация кислорода вследствие реализации различных радиолитических процессов, его уровень в присутствии дипептидов снижается.

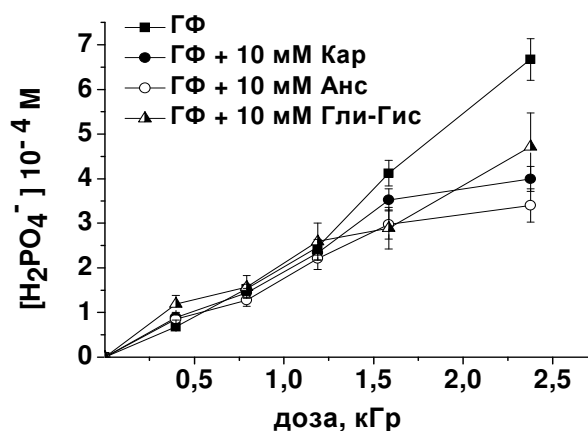


Рисунок 13 – Зависимость накопления $H_2PO_4^-$ от поглощенной дозы при γ -облучении насыщенного кислородом водного 0,1 моль/л раствора ГФ в присутствии глицил-гистидина, карнозина, ансерина

Так, гистидин-содержащие дипептиды ингибируют радиационно-иницируемую фрагментацию ГФ в дезарированных средах. Гли-Гис снижает радиационно-химический выход фосфат-аниона, молекулярного продукта фрагментации, в ~1,6 раза, а Кар и Анс - ~1,8 раза. В системах, насыщенных кислородом, величины выходов фосфат-аниона в присутствии Кар, Анс и Гли-Гис схожи и не отличаются существенно от величины такового в контрольном образце.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При изучении радиационно-иницированных превращений глицеро-1-фосфата было установлено [38, 46, 47], что одним из основных продуктов γ -радиолиза его водных растворов является фосфат-анион. Образование неорганического фосфата происходит преимущественно за счет реакции фрагментации ГФ, схема которой представлена на рисунке 14. Элиминирование фосфат-анионов из первичных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{-C}^{\cdot}(\text{OH})\text{-H}_2\text{C-OP}(\text{O})(\text{O}_2\text{H}^-)$ протекает количественно с константой скорости $> 10^6 \text{ c}^{-1}$ [48].

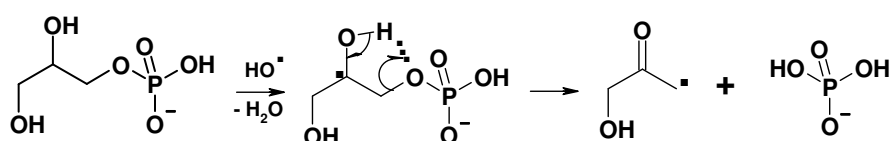
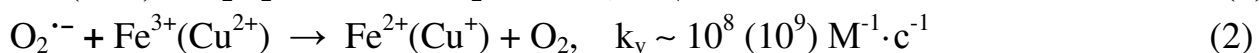
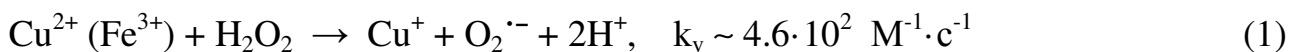


Рисунок 14 - Схема свободнорадикальной фрагментации глицеро-1-фосфата

В настоящей работе в качестве индукторов свободнорадикальных процессов были выбраны редокс-системы $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2/(\text{аскорбат})$ и ионизирующее излучение. Действие γ -излучения на водные раствора биомолекул сопровождается радиолизом воды с образованием активных частиц (H^{\cdot} , HO^{\cdot} , e_{aq}^{-}), которые инициируют реакции деструкции биомолекул, опосредуя косвенное действие излучения [48].

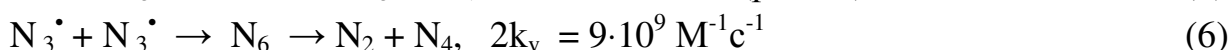
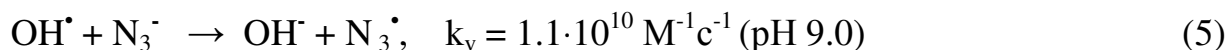
Ионы переходных металлов в реакциях Фентона или Хабера-Вайсса катализируют разложение гидропероксида с образованием радикалов HO^{\cdot} [3, 49]:



Присутствие таких агентов, как аскорбиновая кислота, способствует восстановлению окисленных ионов металлов, увеличивая тем самым выход окислительных частиц [3]:



Среди АФК основной вклад в инициирование свободнорадикальной фрагментации биологически активных производных глицерина вносят гидроксильные радикалы [8, 11, 38, 50]. С литературными данными согласуются полученные результаты о влиянии акцепторов активных частиц на Fe^{2+} (Cu^{2+}) – опосредованную фрагментацию глицеро-1-фосфата. Маннитол и азид натрия существенно ингибируют деструкцию ГФ с элиминированием фосфат-аниона. Маннитол ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) является эффективным акцептором гидроксильных радикалов, константа скорости его взаимодействия с частицами $\text{HO}\cdot$ составляет $2,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (рН 7,0) [51]. Спирт переводит радикалы $\text{HO}\cdot$ в менее активные радикальные частицы, которые не могут инициировать реакцию фрагментации. Азид натрия также эффективно взаимодействует с радикалами $\text{HO}\cdot$, образующийся при этом азидил-радикал $\text{N}_3\cdot$ менее слабый окислитель, чем $\text{HO}\cdot$ (см. уравнения 5-6) [52]. Взаимодействие азидата натрия с кислородом и гидропероксидом в водной среде не эффективно при нейтральных значениях рН (см. уравнение 7).



Важная роль ионов металлов как компонентов редокс-систем в инициировании свободнорадикальной фрагментации подтверждается данными по влиянию феррозина на Fe^{2+} - опосредованные превращения ГФ. Феррозин практически полностью подавляет образование фосфат-аниона. Это объясняется тем, что феррозин (Fz) – эффективный хелатор ионов железа (II), так как образует с ними очень устойчивый к окислению водорастворимый комплекс Fe(II)Fz_3 с максимумом поглощения при 562 нм (рН 4-9) [53, 54].

В работе исследовали влияние гистидин-содержащих дипептидов, структурные формулы которых представлены на рисунке 15, на свободнорадикальную фрагментацию биологически активных фосфопродуктов глицерина.

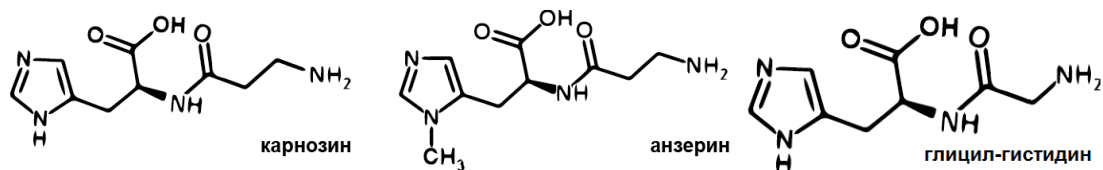


Рисунок 15 – Структурные формулы исследованных в работе дипептидов

Карнозин содержится в организме человека во многих органах (мышцы, мозг, глаза, печень, легкие, почки), но в высоких концентрациях представлен в скелетных мышцах (2-20 мМ) и обонятельных луковицах мозга (0,3-5 мМ) [24]. У карнозина (β -аланил-L-гистидин) существует несколько природных производных, в том числе: N-ацетил-карнозин (N-ацетил- β -аланил-L-гистидин), ансерин (β -аланил-1-метил-L-гистидин) и гомокарнозин (γ -амино-бутирил-L-гистидин). Ансерин не содержится в теле человека, но есть в мышцах позвоночных животных (например, до 40 мМ в мышцах птиц [24]). Глицил-гистидин в организме является метаболитом.

В работе установлено, что гистидин-содержащие дипептиды оказывают анти- или прооксидантное действие на свободнорадикальную фрагментацию ГФ в зависимости от способа инициирования процесса.

ГСД ингибируют *радиационно-иницируемую фрагментацию ГФ* в дезарированных средах. Карнозин и ансерин снижают радиационно-химический выход фосфат-аниона, молекулярного продукта фрагментации, в ~1,8 раза, а глицил-гистидин – в ~1,6 раза. Причем, как установлено на примере Кар, с увеличением концентрации дипептида его протекторное действие усиливается. Известно [3], что антиоксиданты оказывают протекторное действие на свободнорадикальные процессы по одному из механизмов: блокируют инициирование процесса - эффективно реагируют с активными частицами и, тем самым, препятствуют их взаимодействию с молекулами-мишенями; блокируют развитие процесса, восстанавливая образовавшиеся радикалы биомолекул; удаляют медиаторы, которые могут катализировать свободнорадикальные повреждения. Радиопротекторное действие ГСД на фрагментацию ГФ можно объяснить тем, что они эффективно реагируют с радикалами $\text{HO}\cdot$. В работе [55] методом ЭПР показано, что Кар и Гли-Гис акцептируют гидроксильные радикалы, генерированные системой $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, с образованием радикальных интермедиатов. Способность Кар эффективно акцептировать радикалы $\text{HO}\cdot$ была доказана и методом импульсного радиолиза [56, 57]. Авторы работы [55] полагают, что остаток гистидина в молекулах ГСД способствует формированию радикальных интермедиатов дипептидов с частицами $\text{HO}\cdot$ - либо образуется радикал с радикальным центром на имидазольном кольце, либо остаток гистидина стабилизирует радикал с радикальным центром в боковой цепи. В работах [56, 57] также установлено, что радикалы $\text{HO}\cdot$ связываются с имидазольным кольцом карнозина, предпочтительным местом атаки радикалов являются атомы С(2) и С(4) [56]. В реакции Кар с $\text{HO}\cdot$ образуется резонансно стабильный интермедиат, который, по всей видимости, менее реакционно-способен по отношению к биомолекулам, чем исходный радикал $\text{HO}\cdot$ [56]. Из аддукта Кар с $\text{HO}\cdot$ в

основно-катализируемой реакции элиминирования воды, схема которой представлена на рисунке 16, был получен резонансно-стабильный радикал [56].

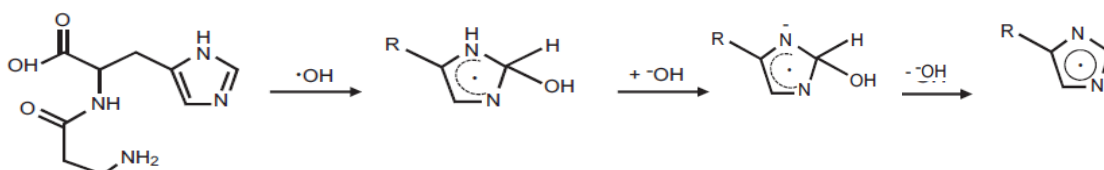


Рисунок 16 – Схема реакции карнозина с гидроксильным радикалом [56]

Ансерин и карнозин оказывали несколько большее ингибирующее влияние на радиационно-иницированное дефосфорилирование ГФ, чем Гли-Гис. Дипептиды Анс и Кар - эффективные акцепторы гидроксильных радикалов, константа скорости реакции Анс с $\text{HO}\cdot$ составляет $5,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, а для Кар - $4,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [43]. Согласно данным работы [55] Гли-Гис также эффективно акцептирует радикалы $\text{HO}\cdot$ и при этом обладает большей активностью, чем Кар. Наблюдаемое некоторое различие в радиопротекторных свойствах ГСД определяется, по всей видимости, их аминокислотным составом.

В кислородсодержащих системах величины радиационно-химических выходов фосфат-аниона в присутствии Кар, Анс и Гли-Гис близки и не отличаются существенно от величины такового в контрольном образце. При избытке кислорода в системах протекают более сложные радиолитические процессы. Первичные углеродцентрированные радикалы $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{-C}\cdot(\text{OH})\text{-H}_2\text{C-OR}(\text{O})\text{O}_2\text{H}^-$ (см. рисунок 14) взаимодействуют с молекулами O_2 с образованием пероксильных радикалов (константа скорости взаимодействия алкильных радикалов с O_2 порядка $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [3]). Процесс окисления первичных радикалов ГФ является конкурентным их реакции фрагментации с разрывом двух β -связей. Это приводит к тому, что выход фосфат-аниона при γ -облучении ГФ в кислородсодержащих системах без добавок снижается в сравнении с деаэрированными растворами. На начальных этапах облучения в кислородсодержащих системах, по всей видимости, вклад в ингибирование фрагментации ГФ могут вносить как ГСД на стадии инициирования процесса, так и молекулярный кислород на стадии развития процесса. На более поздних этапах облучения при «выгорании» кислорода в системах протекторное действие ГСД проявлялось в большей степени.

При исследовании влияния ГСД на фрагментацию ГФ, индуцированную системами Fe^{2+} (Cu^{2+})/ H_2O_2 /аскорбат, установлено, что действие дипептидов может быть как про-, так и антиоксидантным.

ГСД в отличие от большинства биологических антиоксидантов, оказывающих свое действие по одному типу защиты, проявляют несколько антиоксидантных свойств. Они могут не только акцептировать АФК, но и хелатировать ионы металлов, которые катализируют образование активных частиц [24, 43]. Карнозин, в частности, является полидентатным лигандом с пятью потенциальными металл-координирующими сторонами (два имидазольных атома азота, карбоксильная группа, пептидная связь, терминальная аминогруппа) и может образовывать различные (тетра- и окта-) типы комплексов, точная конфигурация которых зависит от размера катиона металла, соотношения лиганд/металл, ионной силы раствора [58, 59].

В случае Fe^{2+} - опосредованной фрагментации ГФ карнозин оказывал ингибирующее влияние, Анс – нейтральное, а Гли-Гис – прооксидантное. Все ГСД эффективно реагируют с радикалами $HO\cdot$, как указывалось выше, но не могут быть эффективными акцепторами частиц H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$, так как слабо с ними взаимодействуют [24, 43]. Различие в действии ГСД на Fe^{2+} - опосредованную фрагментацию может быть связано с их способностью образовывать комплексы с ионами Fe^{2+} и (или) восстанавливать ионы Fe^{3+} .

Свойства Кар и его аналогов связывать ионы железа (II, III) изучены недостаточно, в литературе имеются отдельные противоречивые сведения о возможности образования таких комплексов [24, 59]. Однако известно [60], что гистидин способен эффективно хелатировать катионы Fe^{2+} . Этот факт является предпосылкой того, что ГСД могут образовывать комплексы с ионами железа, свойства которых будут определяться структурой комплекса и электронными эффектами в молекулах лигандов.

Активирующее действие Гли-Гис на фрагментацию ГФ можно объяснить тем, что дипептид либо образует такой комплекс с Fe^{2+} , в котором усиливается каталитическая активность металла в реакции (3), либо он восстанавливает ионы железа (III), способствуя их возвращению в каталитический цикл. Ингибирующее действие карнозина может быть обусловлено либо его способностью акцептировать радикалы $HO\cdot$, если он не образует комплекс с ионами Fe^{2+} , либо дипептид, связываясь с катионами Fe^{2+} , снижает их способность участвовать в реакциях генерирования частиц $HO\cdot$. Способность карнозина ингибировать повреждения ДНК, индуцируемые системой $Fe^{2+}/H_2O_2/аскорбат$, показана в работе [61]. Из работы [62] следует, что антиоксидантная активность карнозина, выделенного из птичьих тканей, обусловлена, в том числе, способностью дипептида хелатировать ионы Fe^{2+} . Однако авторы статьи [63] полагают, что карнозин не хелатирует ионы Fe^{2+} таким образом, что снижает его прооксидантную активность. В целом детальный механизм антиоксидантного действия Кар на Fe^{2+} -опосредованные

процессы требуют дальнейшего углубленного изучения. Нейтральное действие ансерина, хорошего акцептора гидроксильных радикалов, по-видимому, связано с его свойствами взаимодействовать с ионами Fe^{2+} . Согласно литературным данным [64] антиоксидантная активность ГСД не коррелирует с их способностью хелатировать ионы металлов.

Нами также было исследовано влияние свободных аминокислот на Fe^{2+} -опосредованную фрагментацию ГФ. β -Аланин оказывает более слабый протекторный эффект на процесс в сравнении с Кар, гистидин значительно ускоряет фрагментацию ГФ. Полученные данные указывают на то, что важную роль в антиоксидантных свойствах Кар (β -аланил-гистидин) играют пептидная связь и структурная конформация молекулы. β -Аланин может реагировать с радикалами $HO\cdot$ [3], таким образом снижая их долю в атаке на молекулы ГФ. Активирующее действие гистидина в данных условиях может быть обусловлено как его способностью хелатировать ионы железа [60], так и образовывать аддукты с H_2O_2 [65]. Было показано [65], что ионы Fe^{2+} ускоряют разложение H_2O_2 в аддукте гистидин/ H_2O_2 . Прооксидантное действие гистидина в случае Fe^{2+} -опосредованных повреждений ДНК наблюдали и в работе [61].

При иницировании фрагментации глицеро-1-фосфата с помощью Cu^{2+} -содержащей системы все исследованные ГСД ингибировали процесс. В данном случае антиоксидантные свойства ГСД могут быть обусловлены как их взаимодействием с радикалами $HO\cdot$ [24], так и связыванием ионов меди [24, 59]. В работе [57] для карнозина показано, что хелатирование меди дипептидом не влияет на его акцепторные свойства, причем взаимодействие радикалов $HO\cdot$ с комплексом Кар/ Cu^{2+} более избирательно, чем с карнозином, и происходит по C(2) и C(5) атомам имидазольного кольца. В комплексе с ГСД медь вероятно координирована так, что экранирован ее каталитический центр и это приводит к снижению активности хелатированной меди в реакциях с гидропероксидом и соответственно к снижению концентрации радикалов $HO\cdot$. Различие в действии ГСД может быть обусловлено структурой и свойствами их комплексов с ионами Cu^{2+} . Что касается влияния свободных аминокислот на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию ГФ, то β -аланин в сравнении с Кар несколько активирует процесс, а гистидин проявляет значительное протекторное действие. Это может указывать на то, что в случае Cu^{2+} -опосредованного процесса протекторные свойства ГСД определяются главным образом остатком гистидина. Аминокислоты могут хелатировать медь за счет карбокси- и аминогруппы, а также дополнительных донорных групп в боковой цепи [66]. Комплекс Cu^{2+}/β -аланин способствует разложению гидропероксида [67], что приводит к увеличению концентрации радикалов $HO\cdot$ и тем самым активирует

фрагментацию ГФ данной системой. Более сильное ингибиторное действие гистидина в сравнении с Кар может определяться способностью веществ взаимодействовать с ионами меди. Согласно литературным данным у карнозина константа связывания с катионами Cu^{2+} ($1,1 \text{ M}^{-1}$, pH 7,84) более низкая, чем у L-гистидина (71 M^{-1} , pH 7,84) [24].

При исследовании антирадикальных свойств гистидин-содержащих дипептидов и аминокислот, их составляющих, с помощью флуоресцентного зонда, в качестве которого выступала 2-ГТФ, было показано, что Гли-Гис в большей степени подавляет флуоресценцию 2-ГТФ, в сравнении с Кар и Анс, что согласуется с их влиянием на свободнорадикальную фрагментацию ГФ. Ала повышает флуоресценцию 2-ГТФ в $\sim 1,3$ раза, что указывает на увеличение количества радикалов $\text{HO}\cdot$, генерируемых редокс-системой $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. ГСД проявляют такие же антирадикальные свойства как азид натрия, эффективный акцептор частиц $\text{HO}\cdot$, и тролокс, который является водорастворимой формой витамина Е, а также являются более эффективными, чем маннитол, который широко используется в качестве антиоксиданта в биосистемах. Полученные данные указывают на важную роль остатков гистидина и пептидной связи в механизме антиоксидантного действия ГСД [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что гистидин-содержащие дипептиды ингибируют радиационно-иницируемую фрагментацию глицеро-1-фосфата в дезаэрированных средах. Карнозин и ансерин снижают выход молекулярного продукта фрагментации в ~1,8 раза, глицил-гистидин – в ~1,6 раза. Действие дипептидов носит концентрационно-зависимый характер.

Показано, что в случае Fe^{2+} -опосредованной фрагментации ГФ уровень молекулярного продукта в присутствии карнозина и β -аланина снижается соответственно в 1,4 и 1,2 раза, в присутствии Гли-Гис и гистидина – увеличивается в 2,5-3 раза, Анс не оказывает существенного эффекта.

Установлено, что в случае Cu^{2+} -опосредованной фрагментации ГФ Анс, Гли-Гис и гистидин фактически полностью подавляют процесс, карнозин снижает уровень фосфат-аниона в 2,5 раза, а β -аланин повышает таковой в 1,2 раза.

Выявлено, что антиоксидантное действие карнозина (β -аланил-L-гистидин) эффективнее в случае Cu^{2+} -опосредованной фрагментации ГФ и проявляется во всем исследованном диапазоне концентраций (0,5-10 мМ), при Fe^{2+} -опосредованном процессе – значительный эффект наблюдали с концентрации 5 мМ. Данные по влиянию свободных β -аланина и L-гистидина на фрагментацию ГФ указывают на важную роль дипептидной связи в защитных свойствах карнозина.

В целом было установлено, что гистидин-содержащие дипептиды оказывают анти- или прооксидантное действие на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата в зависимости от способа инициирования процесса. При этом карнозин проявляет протекторные свойства, независимо от вида индуктора. Показано, что ингибирующее действие гистидин-содержащих дипептидов на радиационно-иницированное дефосфорилирование глицеро-1-фосфата зависит от концентрации кислорода и максимально в дезаэрированных системах. Выявлено, что карнозин снижает уровень молекулярного продукта свободнорадикальной фрагментации глицеро-1-фосфата в дозо-зависимой манере.

ПУБЛИКАЦИИ И ПРЕЗЕНТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ НА КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. Шендикова, Е.Н. Влияние карнозина на Fe^{2+} -опосредованную деструкцию биологически активных производных глицерина / Е.Н. Шендикова, И.Л. Юркова А. Копырин, // XII Междун. конф. «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы», 11-12 апреля 2014, Минск, Беларусь : сб. матер. / редкол. : В.А. Прокашева (отв. ред.) [и др.] – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2014 – С. 265-268.
2. Юркова, И.Л. Изучение влияния карнозина на фрагментацию глицеро-1-фосфата, индуцированную редокс-системами / Е.Н. Шендикова, И.Л. Юркова // 71 научн. конф. студентов и аспирантов БГУ, 18-21 мая 2014 г., Минск, Беларусь, сб. работ в 3-х частях, Ч. 1 / Мн.: Изд. Центр БГУ, 2014 – С. 327-331.
3. Юркова, И.Л. Свободнорадикальная фрагментация фосфолипидов и способы ее химической коррекции / И.Л. Юркова, А. Копырин, Е.Н. Шендикова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф.; Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 17–20 июня 2014 г., Минск, Беларусь : сб. ст. в 2-х частях, Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2014 – С. 145-147.
4. Юркова, И.Л. Изучение антирадикальных свойств биологически активных соединений методом флуоресцентных зондов / И.Л. Юркова, Е.Н. Шендикова, А.Ю. Костюк, Л. Буданицкая // 4-я Республиканская научная конференция по аналитической химии Ч-52 с международным участием «Аналитика РБ – 2015» : сб. тез. докл., Минск 15 – 16 мая 2015 г. / редкол.: Е.М. Рахманько [и др.]. – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2015 – С. 115.
5. Шендикова, Е.Н. Изучение влияния гистидин-содержащих дипептидов на свободнорадикальную деструкцию глицерофосфата методом фотоколориметрии / Е.Н. Шендикова, И.Л. Юркова // 4-я Республиканская научная конференция по аналитической химии Ч-52 с международным участием «Аналитика РБ – 2015» : сб. тез. докл., Минск 15 – 16 мая 2015 г. / редкол.: Е.М. Рахманько [и др.]. – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2015 – С. 116.
6. Юркова, И.Л. Влияние цистеин-содержащих пептидов на свободнорадикальное дефосфорилирование глицерофосфата / И.Л. Юркова, Е.Н. Шендикова // Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни» : сб. тез. докл., Минск 25-26

- июня 2015 г. / редкол.: О.И. Шадыро [и др.]. – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2015 – С. 164-165 (в печати).
7. Юркова, И.Л. Карнозин в регулировании свободнорадикальной фрагментации фосфолипидов в модельных мембранах / И.Л. Юркова, Е.Н. Шендикова // Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни» : сб. тез. докл., Минск 25-26 июня 2015 г. / редкол.: О.И. Шадыро [и др.]. – Мн.: Изд. Центр БГУ, 2015 – С. 166-167 (в печати).
8. Юркова, И.Л. Гистидин-содержащие дипептиды в регулировании свободнорадикальной фрагментации биологически активных производных глицерина / И.Л. Юркова, Е.Н. Шендикова // IX Международная конференция «Биоантиоксидант» Москва, 29 сентября - 2 октября 2015 г. (принята к печати).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function [Text] / W. Droge // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47–95.
2. Андреев, А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях [Текст] / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков. // *Биохимия* – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246–264.
3. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine [Text] : fourth edition / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford: University press, 2012. – 851 p.
4. Allen, R.G. Oxidative stress and gene regulation [Text] / Allen, R.G., M. Tresini // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, № 3. – P. 463–499.
5. Hawkins, C.L. Generation and propagation of radical reactions on proteins [Text] / Hawkins C.L., M.J. Davies // *Biochim. Biophys. Acta* – 2001. – Vol. 1504, № 2/3. – P. 196–219.
6. Niki, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects [Text] / E. Niki // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47. – P. 469–484.
7. Postle, A.D. Phospholipid lipidomics in health and disease [Text] / A.D. Postle // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2009 – Vol. 111. – P. 2–13.
8. Yurkova, I.L. Free-radical reactions of glycerolipids and sphingolipids [Text] / I.L. Yurkova // *Russian Chemical Reviews* – 2012. – Vol. 81, № 2. – P. 175–190.
9. Practico, D. F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo [Text] / D. Practico // *Atherosclerosis*. – 1999. – Vol. 147, № 1. – P. 1–10.
10. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling [Text] / Y. Yang [et al.] // *Acta Biochemica Polonica* – 2003. – Vol. 50, № 2. – P. 319–336.
11. The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone [Text] / I.P. Edimicheva [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1997. – Vol. 71. – P. 555–560.
12. Shadyro, O.I. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane [Text] / O.I. Shadyro, I.L. Yurkova, M.A. Kisel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2002. – Vol. 78. – P. 211–217.
13. Formation of phosphatidic acid, ceramide and diglyceride on radiolysis of lipids identification by MALDI-TOF mass spectrometry [Text] / O.I. Shadyro [et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36, № 12. – P. 1612–1624.
14. Radiation-induced fragmentation of cardiolipin in a model membrane [Text] / O.I. Shadyro [et al.] // *Int. J. Rad. Biol.* – 2004. – Vol. 80. – P. 239–245.

15. Shadyro, O.I. Free – radical fragmentation of galactocerebrosides: a MALDI-TOF mass spectrometry study [Text] / O.I. Shadyro, I.L. Yurkova, M.A. Kisel, J. Arnhold // *Chem. Phys. Lipids.* – 2005. – Vol. 134. – P. 41 – 49.
16. Formation of phosphatidic acid in stressed mitochondria [Text] / I.L Yurkova [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 480, № 1. – P. 17–26.
17. Юркова, И.Л. Радиационно-инициированная свободнорадикальная фрагментация церамидов в модельной системе [Текст] / И.Л. Юркова, Ю. Арнхольд // *Химия высоких энергий.* – 2009. – Т. 43, № 4. – С. 320–325.
18. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* [Text] / Y. Mine, E. Li-Chan, B. J. John. – Wiley & Sons, 2011. – 436 p.
19. Hettiarachchy, N.S. *Bioactive Food Proteins and Peptides Applications in Human Health* [Text] / N.S. Hettiarachchy, K. Sato, M.R. Marshall, A. Kannan. – CRC Press, 2011. – 368 p.
20. Elias, R.J. Antioxidant activity of protein and peptides [Text] / R.J. Elias, S.S. Kellerby, E.A. Decker // *Cr. Rev. Food Sci.* – 2008. – Vol. 48. – P. 430–441.
21. Sarmadi, B.H. Antioxidative peptides from food proteins: A review [Text] / B.H. Sarmadi, A. Ismail // *Peptidies.* – 2010. – Vol. 31, № 10. – P. 1949–1956.
22. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry [Text] / K. Saito [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51. – P. 3668–3674.
23. Хавинсон, В.Х. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения [Текст] / В.Х., Хавинсон, В.Г. Морозов – СПб.: Фолиант, 2001. – 159 с.
24. Boldyrev, A.A. Physiology and pathophysiology of carnosine [Text] / A.A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol. 93, № 4. – P. 1803–1845.
25. Hipkiss, A.R. Carnosine and its possible roles in nutrition and health [Text] / A.R. Hipkiss // *Adv. Food. Nutr. Res.* – 2009. – № 57. –P.87– 154.
26. Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1976. – 958 с.
27. Mehta, R. Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity. II. Copper toxicity [Text] / R. Mehta, D. Templeton, P. J. O'Brien // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – Vol. 163, № 1. – P. 77–85.
28. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats [Text] / P.B. Walter [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 4. – P. 2264–2269.
29. Miller, D.M. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions [Text] / D.M. Miller, G.R. Buettner, S.D. Aust // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. – Vol. 8. – P. 95 –108.
30. Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide [Text] / J.A. Simpson [et al.] // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 254. – P. 519 –523.

31. Goldstein, S. The Fenton reagents [Text] / S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – Vol. 15, № 4. – P. 435–445.
32. Черенкевич, С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Монография / С.Н. Черенкевич, Г.Г. Мартинович. – Мн.: БГУ, 2008. – 159 с.
33. Метелица, Д.И. Инициирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах [Текст] / Д.И. Метелица, Е.И. Карасёва // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537–564.
34. Valko, M. Metals, toxicity and oxidative stress [Text] / M. Valko, H. Morris, M. T.D. Cronin // *Current Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1161–1208.
35. Юркова, И.Л. Свободнорадикальная фрагментация в полярной части липидов: новый путь деструкции и образования биологически активных соединений: дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.09 / И.Л. Юркова. – Минск, 2010. – 297 л.
36. Eeman, M. Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes [Text] / M. Eeman, M. Deleu // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 719–736
37. Юркова, И.Л. Свободнорадикальные превращения липидов [Текст] / И.Л. Юркова. // *Известия НАН Беларуси. Серия химических наук.* – 2010. – №3. – С. 115–121.
38. Кисель, М.А. Радиационно-инициированная свободнорадикальная фрагментация биологически активных глицеридов [Текст] / М.А. Кисель, О.И. Шадыро, И.Л. Юркова // *Химия высоких энергий.* – 1997. – Т. 31, № 2. – С. 99–103.
39. Davies, V.J. Advances in detailed reaction mechanisms / V.J. Davies, B.C. Gilbert // Ed. J. M. Coxon. – 1991. – Vol. 1. – P. 36.
40. Mannion, A.F. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans [Text] / A.F. Mannion // *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* – 1992. – Vol. 64, № 1. – P. 47–50.
41. Болдырев, А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине / А.А. Болдырев. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 320 с.
42. Gariballa, S.E. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential [Text] / S.E. Gariballa, A.J. Sinclair. – *Brit. Ger. Society.* – 2000. – Vol. 29, № 1. – P. 207–210.
43. Aruoma, O.I. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? [Text] / O.I. Aruoma, M.J. Laughton, B. Halliwell // *Biochem. J.* – 1989. – Vol. 264, №3. – P. 863–869.
44. Изучение антирадикальных свойств биологически активных соединений методом флуоресцентных зондов / Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.,

Костюк А.Ю., Буданицкая Л. // 4-я Республиканская научная конференция по аналитической химии Ч-52 с международным участием «Аналитика РБ – 2015»: сб. тез. докл., Минск 15 – 16 мая 2015 г. / редкол.: Е.М. Рахманько [и др.]. – Минск : Изд. Центр БГУ, 2015 – С. 115.

45. Gin, F.J. Application of one-step procedure of measurement of inorganic phosphate in the presence of proteins actomyosin ATPase System [Text] / F.J. Gin, F. Morales // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 77, № 1. – P. 10–18.

46. Samuni, A. Hydroxyl radical reaction with phosphate ester and the mechanism of phosphate cleavage [Text] / A. Samuni, P. Neta // *J. Phys. Chem.* – 1973. – Vol. 77, № 20. – P. 2425–2429.

47. Schuchmann, M.N. Reaction of hydroxyl radicals with alkyl phosphates and the oxidation of phosphatoalkyl radicals by nitro compounds [Text] / M.N. Schuchmann, M.L. Scholes, H. Zegota, C. von Sonntag // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1995. – Vol. 68, № 2. – P. 121–131.

48. Пикаев, А.К. Современная радиационная химия: Основные положения. Экспериментальная техника и методы [Текст] / А.К. Пикаев; отв. ред. В.И. Спицын. – М.: Наука, 1985. – 375 с.

49. Ozawa, T. The first ESR spin-trapping evidence for the formation of hydroxyl radical from the reaction of copper(II) complex with hydrogen peroxide in aqueous solution [Text] / T. Ozawa, A. Hanaki // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* – 1991. – Vol. 5. – P. 330–332.

50. Olshuk, V.N. Influence of lipids with hydroxyl-containing head groups on Fe²⁺ (Cu²⁺)/H₂O₂-mediated transformation of phospholipids in model membranes [Text] / V.N. Olshuk, I.V. Melsitova, I.L. Yurkova // *Chem. Phys. Lipids.* – 2014 – Vol. 177. – P. 1–7.

51. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ([•]OH/O[•]) in aqueous solution [Text] / G.V. Buxton [et al.] // *J. Phys. Chem. Reference Data.* – 1988. – Vol. 17, № 2. – P. 513–886.

52. Betterton, E.A. Environmental fate of sodium azide derived from automobile airbags [Text] / E.A. Betterton // *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 423–458.

53. Stookey, L.L. Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron [Text] / L.L. Stookey // *Anal. Chem.* – 1970. – Vol. 42, № 7. – P. 779 – 781.

54. Antioxidant activity of Ferrozine–iron–amino acid complexes [Text] / B.S. Berlett [et al.] // *PNAS.* – 2001. – Vol. 98, № 2. – P. 451–456.

55. Chan, W.K.M. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides [Text] / W.K.M. Chan, E.A. Decker, J.B. Lee, D.A. Butterfield // *J. Agric. Food Chem.* – 1994. – Vol. 42. – P. 1407–1410.

56. Tamba, M. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution [Text] / M. Tamba A. Torreggiani // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1998. – Vol. 74. – P. 333–340.
57. Tamba, M. Hydroxyl radical scavenging by carnosine and Cu(II)-carnosine complexes: a pulse-radiolysis and spectroscopic study [Text] / M. Tamba A. Torreggiani // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75. – P. 1177–1188.
58. Diez, R.P. A density functional study of some physical properties of carnosine (N-β-alanyl-L-histidine) [Text] / R.P. Diez, E.J. Baran // *J. Mol. Struct.* – 2003. – Vol. 621. – P. 245–251.
59. Baran, E.J. Metal complexes of carnosine [Text] / E.J. Baran // *Biochem. (Moscow)* – 2000. – Vol. 65, № 7. – P. 789–797.
60. Lavanant, H. Complexes of L-histidine with Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} studied by electrospray ionization mass spectrometry [Text] / H. Lavanant, E. Hecquet, Y. Hoppilliard // *Int. J. Mass. Spectrom.* – 1999. – Vol. 185. – P. 11–23.
61. Mozdzan, M. Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions [Text] / M. Mozdzan, J. Szemraj, J. Rysz, D. Nowak // *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol. 96, № 5. – P. 352–360.
62. Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues [Text] / P. S. Manhiani [et al.] // *Poultry Science.* – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 444–453.
63. Decker, E.A. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron [Text] / E.A. Decker, , A.D. Crum, J.T. Calvert // *J. Agric. Food Chem.* – 1992. – Vol. 40. – P. 756–759.
64. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein [Text] / H.M. Chen [et al.]. // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – Vol. 46, № 1. – P. 49–53.
65. Schubert, J. Does hydrogen peroxide exist “free” in biological systems [Text] / J. Schubert, J.W. Wilmer // *Free Radic. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 11. – P. 545–555.
66. Болотин, С.Н. Координационная химия природных аминокислот / С.Н. Болотин, Н.Н. Буков, В.А. Волинкин, В.Т. Панюшкин. – М.: Из-во: ЛКИ, 2008. – 240 с.
67. Lin, T.Y. Activation of hydrogen peroxide in copper(II)/amino acid/ H_2O_2 systems: Effects of pH and copper speciation [Text] / T.Y. Lin, C.H. Wu // *J. Catalysis* – 2005. – Vol. 232, № 1. – P. 117–126.

ПРИЛОЖЕНИЯ