

Литература

1. Kuru E. et al. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth *in situ* // Nature Protocols. – 2015. – Vol. 10. – P. 33–52.
2. Фалетров Я. В., Хорецкий М. С., Завадская О. А., Рати Б., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Шкуматов В. М. Синтез флуоресцентно-меченых аминокислот – потенциальных антималярийных агентов // Вестник БГУ. – 2016. (в печати).
3. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 134. – P. 59–66.
4. Watanabe N., Toyo'oka T., Imai K. HPLC electrochemical fluorometric detection of amino acids including tryptophan using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole // Biomed Chromatogr. – 1987. – Vol. 2. – P. 99-103.
5. Albani J.R. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence : origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: the emission to excitation ratio // J Fluoresc. 2007. – Vol. 17. – P. 406-417.
6. Mbongue J.C. *et al.* The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity // Vaccines (Basel). – 2015. – Vol. 3. – P. 703–729.
7. Lee I. R. *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* requires an intact proline catabolism pathway // Genetics. – 2013. – Vol. 194. – P. 421–433.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
yurkovail@bsu.by*

Активные формы кислорода (АФК) ($\text{HO}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , HClO) в биосистемах играют ключевую роль в развитии многих патологических процессов, а также в сигнальной трансдукции. АФК идентифицируют

прямым методом (ЭПР) или косвенно с помощью химических зондов, в том числе флуоресцентных. 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 [1]. Метод флуоресцентных зондов позволяет не только детектировать АФК в различных системах, но и служит простым инструментом для получения информации об антиоксидантных свойствах различных соединений.

Целью данной работы было исследование антиоксидантных свойств гистидин-содержащих дипептидов (ГСД) (карнозин, Кар;ансерин, Анс;глицил-гистидин, Гли-Гис) и составляющих их аминокислот с помощью терефталевой кислоты (ТФ).

ТФ является специфичным и высокочувствительным детектором радикалов $\text{HO}^\cdot$ ($< 0,5$ пикоМ), она не реагирует с другими активными частицами ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2). ТФ взаимодействует с $\text{HO}^\cdot$ ($k_v = 4,4 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) с образованием только одного моно-гидроксированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ). Данный продукт является стабильным и в отличие от ТФ обладает флуоресценцией ($\lambda_{\text{воз}} = 315 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 427 \text{ нм}$). В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов $\text{HO}^\cdot$ прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-ГТФ. Антирадикальные свойства тестируемых веществ оценивали по их способности конкурировать с ТФ за взаимодействие с $\text{HO}^\cdot$, что приведет к снижению концентрации 2-ГТФ и, следовательно, уменьшению интенсивности флуоресцентного сигнала. Радикалы $\text{HO}^\cdot$ генерировали с помощью системы $\text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$. Изменение интенсивности флуоресценции в присутствии тестируемых соединений в сравнении с контролем (ТФ + компоненты редокс-системы) являлось мерой оценки их антиоксидантных свойств.

Установлено, что флуоресцентный сигнал в системе $\text{ТФ} - \text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ резко снижается при добавлении Гли-Гис (рис. 1). Данный дипептид уменьшает интенсивность флуоресценции в ~ 41 раз. Эффект Кар и Анс был слабее, флуоресценция в их присутствии снижалась примерно в четыре и пять раз, соответственно. Действие ГСД сравнивали с влиянием NaN_3 , эффективного акцептора $\text{HO}^\cdot$. Азид натрия ослабляет флуоресценцию системы $\text{ТФ} - \text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ в ~ 7 раз. Антиоксидантные свойства ГСД могут быть обусловлены как их непосредственным взаимодействием с радикалами $\text{HO}^\cdot$, так и способностью влиять на образования активных частиц посредством взаимодействия с ионами металла.

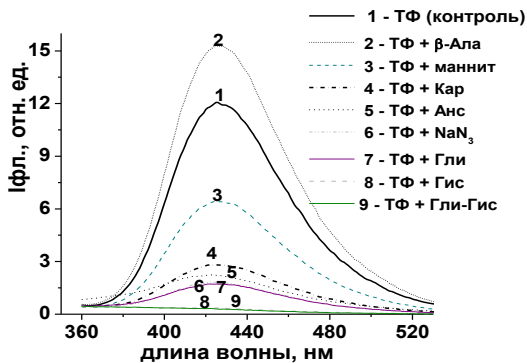
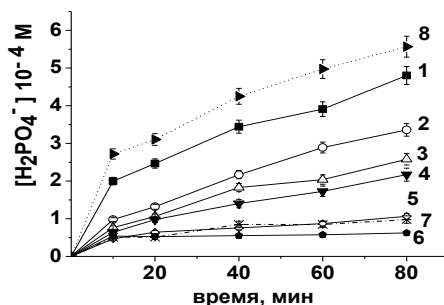


Рисунок 1 – Спектр флуоресценции 2-НО-ТФ, образующегося при действии системы $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ (0,1/1мМ) на 10 мМраствор терефталевой кислоты в присутствии (2 мМ)различных соединений

Из аминокислот глицин и гистидин ослабляют флуоресценцию системы $\text{ТФ-Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ в 7 и 34 раза, соответственно. β -Аланинповышаетфлуоресценцию в 1,3 раза, что указывает на его способность усиливать каталитические свойства ионов меди (II). Согласно данным работы [2] комплекс Cu^{2+}/β -аланин способствует разложению гидропероксида, что будет приводить к увеличению скорости образования радикалов $\text{HO}^\cdot$.

Данные, полученные с помощью флуоресцентного зонда, о способности ГСД и аминокислот регулировать уровень радикалов $\text{HO}^\cdot$ в системе $\text{ТФ-Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ согласуются с их действием на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата (ГФ), индуцированную смесью $\text{CuSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-аскорбат}$ (рис. 2).Протекторное действие ГСД на дефосфорилирование ГФ увеличивалось в ряду Кар – Ала – Гли-Гис (в 2,5; 4,3 и 5,8 раз, соответственно). β -Аланин активирует фрагментацию ГФ с разрывом фосфоэфирной связи в $\sim 1,2$ раза, гистидин уменьшает интенсивность флуоресценции в 5 раз. В соответствии с полученными данными протекторные свойства ГСД обусловлены главным образом остатком гистидина, который оказывал большее ингибирующее действие, чем Кар. Согласно данным работы [3] Кар имеет более низкую константу связывания с катионами Cu^{2+} ($1,1 \text{ M}^{-1}$, pH 7,84), чемL-гистидин (71 M^{-1} , pH 7,84).



1 – без добавок, в присутствии: 2 – 1 мМ Кар, 3 – 5 мМ Кар, 4 – 10 мМ Кар, 5 – 10 мМ Анс, 6 – 10 мМ Гли-Гис, 7 – 5 мМ Гис, 8 – 5 мМ β-Ала

Рисунок 2 – Влияние ГСД и аминокислот на накопление фосфат-аниона в водном 100 мМ растворе ГФ, инкубированном с $\text{CuSO}_4\text{--H}_2\text{O}_2\text{--аскорбат}$ (0,5/10/0,5 мМ) при 37 °С

Так, применение флуоресцентного зонда позволяет получить предварительную оценку анти- и проокислительных свойств соединений в условиях металл-опосредованного генерирования радикалов $\text{HO}^\cdot$.

Литература

1. Gomes A., Fernandes E., Lima J. L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2005. – Vol. 65. – P. 45 – 80.
2. Lin T.Y., Wu C.H. Activation of hydrogen peroxide in copper(II)/amino acid/ H_2O_2 systems: Effects of pH and copper speciation // J. Catalysis – 2005. – Vol. 232, № 1. – P. 117–126.
3. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and Pathophysiology of carnosine // Physiol Rev. – 2013. – Vol.93. – P. 1803–1845.