

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ОДЕРЖАННЯ, ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПЕРЕВІРКА
АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГІСТИДИНОВОГО
МЕТАЛОКОМПЛЕКСУ**

У роботі проведено дослідження з синтезу, ідентифікації металоорганічних комплексів, а саме гістидинатів міді та цинку. Встановлено, що утворення комплексів за участю іонів есенціальних елементів біотиків впливає на розташування смуг і на їх інтенсивність. Антирадикальну активність отриманих сполук визначали як здатність до взаємодії зі стабільним радикалом дифенілпікрилгідрозилом.

Постановка проблеми та аналіз результатів останніх досліджень

Ключовою науковою концепцією, яка лежить в основі інтегрального підходу до розробки системи первинної профілактики та лікування поширених захворювань людини й тварин, є визнання того, що відносно невелика кількість чинників ризику екзогенного походження викликає й посилює перебіг багатьох аліментарних, ендокринних, легеневих, гастроентерологічних та інших захворювань [1–3].

Одним з таких універсальних чинників є оксидативний стрес [4–6]. Розробка методів інтегральної корекції оксидативного стану в організмі тварин за дії різних чинників ризику є важливим фактором у процесі створення біобезпечних та високоефективних препаратів парентерального та перорального призначення. Незначні зміни рН можуть сильно впливати на швидкість метаболічних процесів і стабільність білків, тому всі організми прагнуть підтримувати постійність цих величин. На ранніх етапах еволюції первинної клітини шляхом відбору ці функції стала виконувати амінокислота гістидин, оскільки величина її значення рН відповідає максимальній іонізації внутрішньоклітинних метаболітів, що дозволяє втримувати їх у клітині. При біологічних значеннях рН імідазольні групи гістидину протоновані наполовину, що дозволяє їм виконувати різноманітні функції, які вимагають зворотного приєднання й відщеплення протонів [7]. Зворотне протонування є критичним етапом таких процесів, як: 1) взаємодія ферменту з лігандом; 2) фаза каталізу ферментативної реакції; 3) структурні переходи в молекулах білків; 4) реакції в буферних системах.

Гістидин входить до каталітичного центру деяких антиоксидантних ферментів, наприклад, СОД, виконуючи функції універсального каталізатора, в якому Мідь та Цинк зв'язані з білковою частиною молекули через гістидинатні залишки [8]. У сучасних дослідженнях встановлена і каталітична функція комплексу гістидин–Купрум. За використання препаратів Феруму можлива активація процесів утворення активних форм Оксигену, насамперед одного із найтоксичніших вільних радикалів – синглетного Оксигену. Такі відомі антиоксиданти, як глутатіон, аскорбат і токоферол не інактивують синглетний Оксиген. Нещодавно встановлено, що гістидин або його комплекси з Купрумом ефективно знешкоджують його [9]. Таким чином, на нашу думку, необхідно введення комплексів гістидину до складу препаратів Феруму.

Матеріали і методи

Металокомплекси гістидину синтезовано в лабораторії НДІ екології та біотехнології у тваринництві БНАУ з гістидину та гідроксидів металів, які брали в еквімолекулярних кількостях.

Для ідентифікації продуктів взаємодії на спектрометрі Specord M-80 були зняті їх ІЧ-спектри та ІЧ-спектри амінокислот (АК). Коливальна спектроскопія (інфрачервона та комбінаційного розсіювання) – один з найбільш зручних методів дослідження внутрішньої координаційної сфери комплексів та місця локалізації координаційних зв'язків. У коливальному спектрі виділяють характеристичні частоти, які зсуваються при хелатоутворенні, що свідчить про місце локалізації координаційного зв'язку в металохелатах. ІЧ-спектри створених сполук аналізували в лабораторії фізики БНАУ на спектрометрі Specord M-80. Арбітражну оцінку та підтвердження комплексоутворення проводили в лабораторії спектрального аналізу Інституту судової експертизи Міністерства юстиції України (м. Київ).

Результати досліджень

Проведеними дослідженнями встановлено (рис. 1), що утворення комплексів за участю іонів Купруму та ліганду впливає на розташування смуг та їх інтенсивність. За ІЧ-спектрами встановлено, що в комплексі $[CuHis_2]$ координація тридентатна – за участю аміногруп (валентні і деформаційні коливання зміщуються: $\nu(NH_2)$ 3312 см^{-1} – 3050 см^{-1}) і карбоксигруп та одного з атомів Нітрогену імідазольного кільця з утворенням шестичленних хелатних кілець, що узгоджується з даними Н.Н. Букова [10], в яких за спектрами ЕПР для гістидинатних комплексів встановлено наявність двох ізомерів: у першому – в екваторіальній площині обидва ліганди координували через аміно- та імідазольну групи, в другому – один з лігандів координувався через аміно- й карбоксигрупи; третя донорна група в обох випадках бере участь у координації в аксіальному положенні, що призводить до підвищення стійкості комплексу.

Реалізація типу зв'язку залежить, в основному, від умов перебігу реакції комплексоутворення (рН, склад розчину) та агрегатного стану сполук.

Подальша робота була спрямована на перевірку антиоксидантних властивостей створеного гістидинового комплексу. Останніми роками спостерігається значна зацікавленість вільнорадикальним окисненням за участю кисню та активних інтермедіатів його відновлення, і, як наслідок, препаратом, що здатні впливати на інтенсивність цих процесів. З урахуванням перспектив використання, особливу увагу привертають антиоксиданти. Практичне значення мають такі відомі антиоксиданти, як токоферол, селен. Не менш активно, ніж дослідження вже відомих за антиоксидантними, властивостями препаратів, проводиться пошук нових сполук, які можуть інгібувати вільнорадикальне окиснення на різних стадіях процесу.

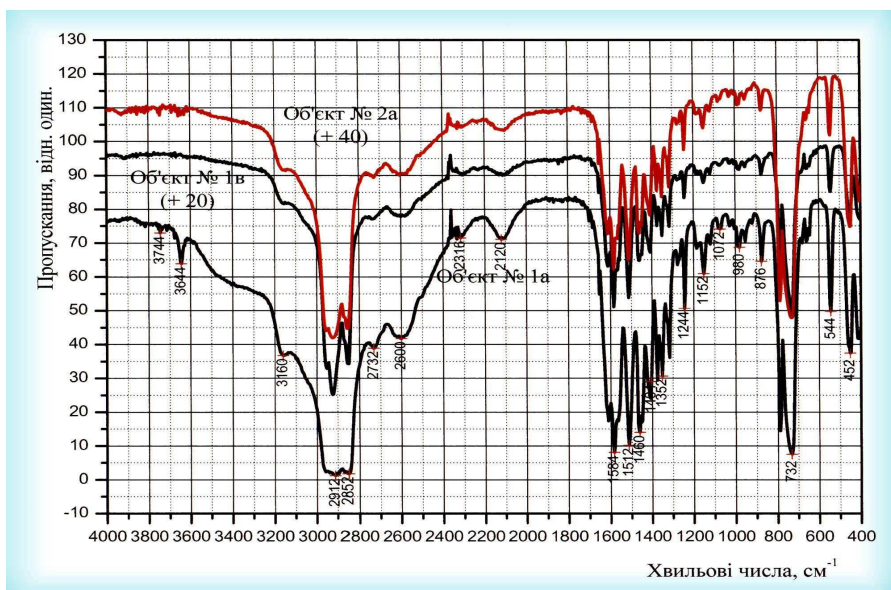


Рис. 1. Інфрачервоні спектри гістидину та гістидинату Купруму

Серед них особливе місце посідають препарати амінокислотного походження, оскільки, являючи собою природні сполуки, вони практично не дають побічних ефектів, що властиво синтетичним сполукам, і легко й органічно вступають в метаболічні процеси в організмі. Електронодонорні групи в бічному ланцюзі мають амінокислоти гістидин і цистеїн, тому вони є найбільш сильними комплексуючими реагентами серед амінокислот, присутніх у крові. Гістидин здатний зв'язуватися з іоном металу чотирма способами, причому можливе утворення п'яти-, шести- або семичленних циклів.

Який з цих варіантів буде реалізований, залежатиме від деяких чинників: переваги металу, що є азотним або кисневим донором електронів, вимог геометрії координаційної сфери (деякі метали не здатні утворювати великі хелатні кільця) і концентрації протонів (тобто рН), що конкурують з іоном металу за електронодонорні групи.

Антирадикальну активність отриманих сполук визначали як здатність до взаємодії зі стабільним радикалом дифенілпікрилгідрозилом. Стабільний радикалДФПГ (дифенілпікрилгідрозил) – це інтенсивно забарвлена кристалічна речовина з максимумом поглинання у видимій ділянці спектра при 517 нм. Дослідження антирадикальної активності сполук за допомогою стабільного радикалаДФПГ дозволяє виявити їх здатність слугувати пастками вільних радикалів.ДФПГ має максимум поглинання за довжини хвилі 517 нм у радикальній формі й при переході в нерадикальну форму зменшує оптичну густину. Величину антирадикальної активності комплексів металів порівнювали з активністю аскорбату та кверцетину (рис. 2).

Для кількісної оцінки антиоксидатної активності створених комплексів нами пропонується параметр – час t_{50} , – необхідний для зниження вихідної концентрації стабільного радикала при реакції його з речовинами на 50 %.

В проведених експериментальних дослідженнях встановлено, що у випадку реакціїДФПГ з гістидинатом Купруму за 37 °С t_{50} для гістидинату Купруму 420 с, а для гістидинату Цинку – 2010 с. Таким чином, за реакційною здатністю нейтралізувати вільні радикали гістидинат Купруму переважає гістидинат Цинку приблизно в 5 разів.

З рисунка 3, на якому наведені кінетичні криві зміни концентрації радикальної формиДФПГ в реакції з відомими антиоксидантами – кверцетином, токоферолом та гістидинатом Купруму, – видно, що всі сполуки досить швидко реагують з радикалом. Кінетичні криві спрямляються в координатах для реакції другого порядку. Таким чином, реакції сполук, які мають антирадикальну активність зі стабільними радикалами, можуть слугувати тестом для попередньої кількісної оцінки їх антирадикальних властивостей.

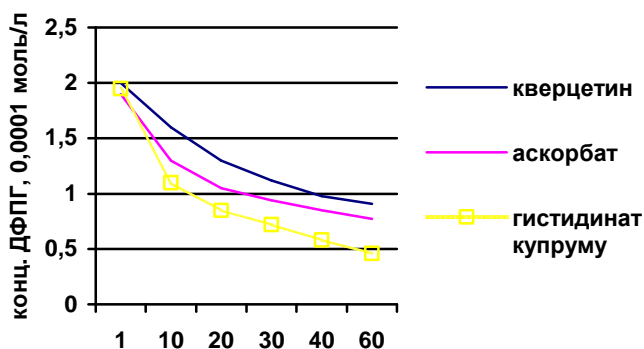


Рис. 3. Кінетичні криві втрачання діфенілпікрілгідразилу в реакціях з кверцетином, аскорбатом та гістидинатом Купруму

Висновки

З синтезованих нами металоорганічних сполук найвищу реакційну здатність з ДФПГ виявлено з гістидинатом Купруму. За реакційною здатністю нейтралізувати вільні радикали, гістидинат Купруму перевищує гістидинат Цинку.

Перспективи подальших досліджень

Наступні дослідження будуть спрямовані на пошук нових сполук з антиоксидантними властивостями, що матимуть змогу інгібувати вільно-радикальне окиснення на різних стадіях процесу.

Література

1. *Беленічев І.Ф.* Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / *І.Ф. Беленічев, Є.Л. Левицький, Ю.І. Губський* // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24–29.
2. *Горчакова Н.О.* Антиоксидантні засоби – необхідні компоненти комплексної фармакотерапії / *Н.О. Горчакова, С.А. Олійник, К.Г. Гаркава* // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 1. – С. 7–13.
3. *Данчук В.В.* Оксидативний стрес – патологічний процес чи адаптація? / *В.В. Данчук, Ю.В. Микитин, О.В. Данчук* // Тваринництво України. – 2004. – № 4. – С. 21–24.
4. *Каліман П.А.* Оксидативний стрес і регуляція метаболізму в екстремальних умовах / *П.А. Каліман* // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 4. – С. 9.
5. *Dalton T.* Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity / *T.Dalton, Q.Li, D.Bittel* // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 42. – P. 26233–24241.
6. *Davies M.* Stable markers of oxidant damage to proteins and their application

- in the study of human disease / *M.Davies, S.Fu, H.Wang* // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, № 11–12. – P. 1151–1163.
7. *Хьюз М.* Неорганическая химия биологических процессов ; пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – 416 с.
 8. *Hosokawa S.* Relationship between haemodialysis anaemia and copper and zinc / *S.Hosokawa, H.Nishitani, K.Umemba* // *Int. Urol. Nephrol.* – 1985. – Vol. 17. – P. 365–371.
 9. *Гонський Я.І.* Вплив ксенобіотиків та металокомплексів гістидину на проникність еритроцитів / *Я.І. Гонський, Є.Б. Дмухальська* // *Буковинський медичний вісник.* – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 60–62.
 10. *Буков Н.Н.* Координационная химия d- и f-элементов с полидентатными лигандами: синтез, строение и свойства : автореф. дис. ... докт. хим. наук : спец. 02.00.01 – неорг. химия / *Н.Н. Буков.* – Краснодар, 2007. – 32 с.