

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОФЕНОЛА И АМИНОКИСЛОТ НА УРОВЕНЬ НИТРОЗИЛ-РАДИКАЛА И ЕГО АКТИВНЫХ ФОРМ *IN VITRO*

© 2024 г. Е. М. Овсянникова¹, А. А. Бурко¹, Г. А. Ксендзова², В. Л. Сорокин^{1,2},
Е. Г. Каранкевич³, И. Л. Юркова^{1,2,*}

¹ Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

² Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030 Беларусь

³ Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь
*e-mail: yurkovail@tut.by

Поступило в редакцию 15 июля 2024 г.

После доработки 3 сентября 2024 г.

Принято к печати 4 сентября 2024 г.

Изучено влияние аминифенола, аминокислот и их производных на уровень $\cdot\text{NO}$ и его активных форм ($\cdot\text{NO}_2$, N_2O_3) в водной аэробной среде ($\text{pH} = 7.4$) с использованием нитропруссид в качестве донора $\cdot\text{NO}$. Установлено, что наибольшую NO_x -акцепторную активность проявляют 3-аминифенол ($\text{IC}_{50} = 0.11$ мМ.), 2-аминифенол ($\text{IC}_{50} = 0.195$ мМ.) и 4,6-ди-*трет*-бутил-2-аминифенол ($\text{IC}_{50} = 0.12$ мМ.), стандарты – тролокс ($\text{IC}_{50} = 0.19$ мМ.) и аскорбат ($\text{IC}_{50} = 4.88$ мМ.). Метилирование по ОН-группе снижает эффективность аминифенола. В исследованном концентрационном диапазоне (0–75 мМ.) Тир-Ала ($\text{IC}_{50} = 5.0$ мМ.) и β -Ала-Нис ($\text{IC}_{50} = 35.0$ мМ.) активнее, чем Phen-Ала ($\text{IC}_{50} > 50$ мМ.) и Gly-Gly ($\text{IC}_{50} > 50$ мМ.). Комплексы $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и $\text{Cu}(\text{Gly-Gly})_2$ при низких концентрациях (0.05–0.5 мМ.) в 1.4–1.8 раза эффективнее, чем Gly и Gly-Gly.

Ключевые слова: нитрозил-радикал, активные формы азота, производные аминифенола, дипептид, комплекс $\text{Cu}(\text{II})$ –дипептид

DOI: 10.31857/S0044460X24060077, **EDN:** EZCTFV

ВВЕДЕНИЕ

Монооксид азота [оксид азота(II) или нитрозил-радикал $\cdot\text{NO}$] в организме образуется в ходе как ферментативных (окисление L-аргинина, катализируемого NO-синтазами), так и неферментативных (диспропорционирование нитрита в кислой среде, $\text{pH} < 6.0$, и др.) процессов [1–3]. NO является внутри- и внеклеточным переносчиком, играет важную роль во многих физиологических процессах (нейротрансмиссия, регуляция артериального давления, иммунный и воспалительный ответ, и др.) [1–3].

Монооксид азота [$E^\circ(\cdot\text{NO}/^3\text{NO}^-) = -0.8$ В, $\text{pH} = 7.0$; $E^\circ(\cdot\text{NO} + \text{H}^+)/^1\text{HNO} = -0.5$ В, $\text{pH} = 7.4$; $E^\circ(\text{NO}^+/\cdot\text{NO}) = 1.45$ В; $E^\circ(2\cdot\text{NO}, 2e^-, 2\text{H}^+/\text{N}_2\text{O},$

$\text{H}_2\text{O}) = 1.59$ В] обладает редокс-гибкостью, может выступать как донором, так и акцептором электрона в окислительно-восстановительных реакциях [4–7]. Нитрозил-радикал не способен инициировать отрыв атома Н от макромолекул и присоединяться по двойной связи, но активно взаимодействует со свободными радикалами, ионами переходных металлов (не- и гемовое железо, металлокомплексы) [3, 4, 7].

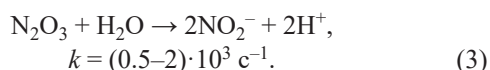
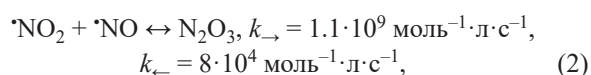
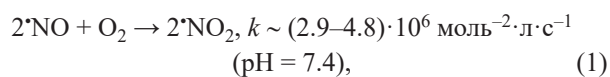
Монооксид азота в организме оказывает как анти-, так и прооксидантное действие [1, 2, 7–15]. Главным фактором, который определяет биологические эффекты NO, является его концентрация. В ходе процессов биорегуляции наблюдаются низкие концентрации NO (10^{-9} – 10^{-6} М.), однако при опре-

деленных условиях, например стимуляции макрофагов, уровень NO может значительно повышаться ($>10^{-6}$ М.) [7, 9, 11]. Чрезмерное образование NO связано со многими патологиями (ревматоидный артрит, астма, атеросклероз, воспаление, нейродегенерация) [1, 2, 14, 15].

Прооксидантное действие NO может проявляться как вследствие его прямого взаимодействия с биомолекулами, так и косвенно, через активные формы, а именно оксид азота(IV) [$E^\circ(\text{NO}_2/\text{NO}_2^-) = 0.99\text{--}1.1$ В)] и оксид азота(III) [азотистый ангидрид, сесквиоксид азота, $E^\circ(\text{N}_2\text{O}_3/\text{NO}, \text{NO}_2^-) = 0.8$ В] [6–8, 10]. Диксид азота способен вступать в различные реакции: отрыв атома Н от связи С–Н, присоединение к связям С=С, перенос атома О, присоединение к свободным радикалам и перенос электрона [16]. Сесквиоксид азота является нитрозирующим агентом в аэрированных водных растворах монооксида азота [8, 9, 17]. Образование высших оксидов азота сопряжено с автоокислением NO. В водных растворах в присутствии молекулярного кислорода ($[\text{O}_2] = 2.4 \cdot 10^{-4}$ М., pH = 7.4) NO (растворимость в воде 1.8 мМ. при 25°C [18]) почти полностью превращается в нитрит-анион (HNO_2 , $\text{pK}_a = 3.37$). Механизм превращения сложный, реализуется через протекание реакций (1–3), представленных на схеме 1 [6, 7, 19]. На первой стадии образуется NO_2 , который далее в обратимой реакции с NO трансформируется в N_2O_3 . В водной среде N_2O_3 , в отсутствие других мишеней, гидролизует с образованием NO_2^- [19].

Лимитирующей стадией образования NO_2^- является тримолекулярная реакция NO с O_2 [уравнение (1)], которая имеет суммарный третий порядок (второй по $[\text{NO}]$, первый по $[\text{O}_2]$). Скорость реакции автоокисления NO в водном растворе зависит от его концентрации [7, 19].

Схема 1.



Окисление и нитрозирование различных веществ в аэробных условиях может происходить с участием NO, NO_2 и N_2O_3 , а также пероксинитрита ONOO^- [$E^\circ(\text{ONOO}^-/\text{NO}_2, \text{HO}^-) = 1.2\text{--}1.6$ В, pH = 7.0; ONOOH , $\text{pK}_a = 6.8$] [6], образующегося в реакции NO с супероксид-анион-радикалом [$E^\circ(\text{O}_{2(\text{aq})}/\text{O}_2^{\bullet-}) = -0.16$ В [20]] [7, 9, 10]. Превалирование того или иного процесса будет определяться константами скоростей реакций, концентрацией реагентов и окружающими условиями. Активные формы азота (NO , NO_2 , N_2O_3 , ONOO^-) способны вызывать дезаминирование аминокислот и оснований ДНК, образование нитрозотиолов (RSNO) и нитрозоаминов ($\text{R}^1\text{R}^2\text{NNO}$), нитрование белков (остатков тирозина и триптофана), усиливать перекисное окисление липидов [1–3, 7, 8]. В конечном итоге активные формы азота опосредуют развитие как нитрозативного, так и окислительного стресса [1–3, 7–11], механизм которого будет определяться видом и концентрацией образующихся активных частиц, что в свою очередь определяется клеточной средой.

Подходы к элиминированию избытка активных форм азота и предотвращению нитрозативного стресса до конца не определены. Актуальным является изучение способности различных соединений регулировать уровень активных форм азота. Значимую роль в антиоксидантной системе организма играют аминокислоты (АК) и их производные [21]. Активность в отношении активных форм азота наиболее изучена для триптофана, тирозина и цистеина [21]. Метионин, фенилаланин, гистидин, лизин и аргинин модифицируются при действии пероксинитрита [8, 21, 22]. В работе [23] изучена NO-акцепторная активность аминокислот с разветвленной цепью (лейцин, валин, изолейцин). Интенсивно исследуется NO-активность пептидов, выделенных из белковых гидролизатов [24–26]. Несмотря на большой накопленный материал, детальный механизм вовлечения производных аминокислот в регулирование свободно-радикальных процессов с участием NO остается открытым. С этой точки зрения, интересными объектами исследования являются дипептиды. Как известно [27, 28], они проявляют различную биологическую активность, включая антиоксидантную, и вследствие своих свойств (лучшее усваивание, чем у свободных аминокислот и белковых гидролизатов, способность проникать через биомембраны и

гематоэнцефалический барьер) являются привлекательными терапевтическими средствами.

Среди антиоксидантов важное место занимают природные фенолы и их синтетические функционализированные производные [29–31]. Фенольные соединения обладают потенциалом регулировать уровень NO [32–36]. Такие функционализированные фенолы, как производные аминифенола, проявляют противораковую, противовирусную и антирадикальную активность [37–41], при этом их роль в регулировании процессов с участием активных форм азота исследована недостаточно.

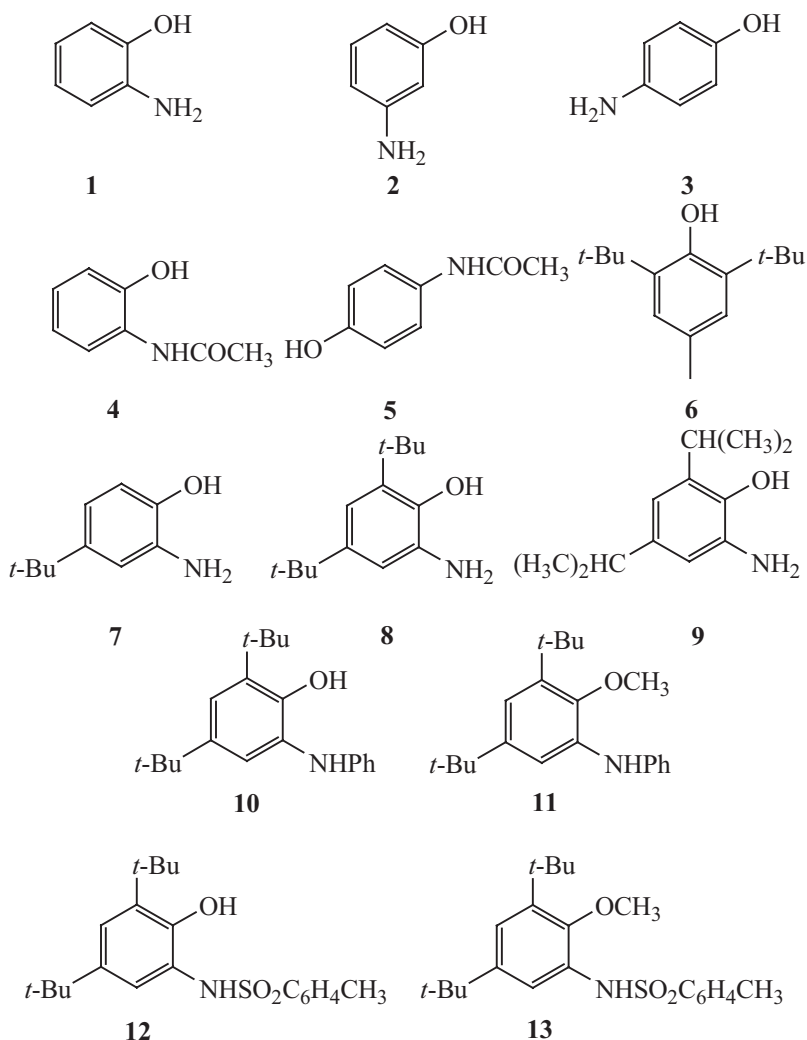
Целью настоящей работы было изучение способности отдельных производных аминифенола и

аминокислот регулировать уровень нитрозил-радикала и его активных форм ($\cdot\text{NO}_2$, N_2O_3) в водной аэробной среде, используя нитропруссид в качестве донора $\cdot\text{NO}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно [42, 43], что нитропруссид натрия под воздействием света в водной среде (pH = 7.4) спонтанно разлагается с выделением NO. Нитрозил-радикал в аэробной среде окисляется до устойчивого метаболита, нитрит-аниона, через стадии образования промежуточных интермедиатов, как указано на схеме 1. Эффективность используемой тест-системы предварительно оценивали по

Схема 2.



известным акцепторам активных форм азота (NaN_3 , пиперазин, дофамин, H_2O_2 , аскорбиновая кислота, 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) [44–50]. Полученные данные подтверждают то, что тест-система на основе нитропруссид натрия позволяет оценить общую активность соединения в отношении NO_x (NO , NO_2 , N_2O_3) в физиологически значимых условиях. Концентрация NO_2^- в тест-системе в присутствии исследуемых соединений в сравнении с контрольной без добавок таковых выступает мерой их способности регулировать уровень NO_x .

На схеме 2 представлены структурные формулы исследованных функционализированных фенолов. Выбор производных 2-аминофенола обусловлен тем, что ранее в наших исследованиях установлена их противовирусная и антиоксидантная активность [39–41, 51]. Аминофенол **10** является активным действующим началом противогерпетического препарата Бутаминофен, выпускаемого РУП «Бел-медпрепараты».

На рис. 1 представлены зависимости концентрации нитрит-аниона в тест-системе (в % от контроля) от концентрации тестируемого соединения $[\text{S}]$, полученные для соединений **1–3**, **7**, тролокса и убихинона Q_0 , не содержащего в отличие от фенольных соединений OH -групп. Как видно из данного

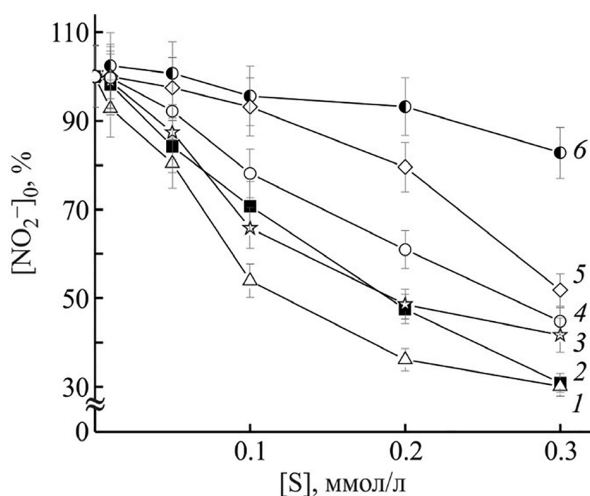


Рис. 1. Накопление нитрит-аниона в тест-системе нитропруссид натрия–PSB (10/10 ммМ., pH = 7.4) в присутствии функционализированных фенолов: **1** – **2**, **2** – тролокс, **3** – **1**, **4** – **3**, **5** – **7**, **6** – убихинон Q_0 .

рисунка, среди изомеров аминокфенолы **2** и **1** обнаруживают большую или схожую NO_x -акцепторную активность в сравнении со стандартным тролоксом, величины их индекса IC_{50} составляют 0.11, 0.195 и 0.19 ммМ. соответственно. 4-Аминокфенол уступает по эффективности другим изомерам, величина его IC_{50} составила 0.31 ммМ. Введение *трет*-бутильного заместителя в *пара*-положение к OH -группе у 2-аминокфенола незначительно изменило его активность, для соединения **7** IC_{50} = 0.24 ммМ. Для соединений **4**, **5** и убихинона Q_0 получены схожие зависимости %, $[\text{NO}_2^-]_0 - [\text{S}]$, поэтому, чтобы не перегружать рис. 1, они не приводятся. В исследованном концентрационном диапазоне (0–3.0 ммМ.) данные N-ацетилированные производные 2- и 4-аминокфенола проявляют слабый эффект: при 3 ммМ. снижают уровень NO_2^- на ~12–15% в сравнении с контролем.

На рис. 2 представлены результаты, полученные для стерически затрудненных аминокфенолов и их производных, которые исследованы в более узком концентрационном диапазоне (0–0.15 ммМ.) вследствие их ограниченной растворимости в водных системах. NO_x -Акцепторная активность данных соединений убывает в следующем ряду: **8** (IC_{50} = 0.125 ммМ.) > тролокс > **9** > **10** > **12** > **11** ≥ **13** ≥ **6** (ионол). Надо отметить, что соединение **12** в сравнении с аминокфенолом **11** оказалось более эффективно только при

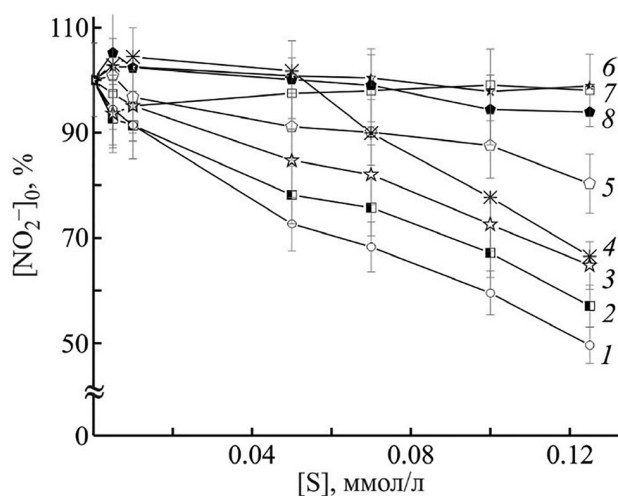


Рис. 2. Накопление нитрит-аниона в тест-системе нитропруссид натрия–PSB (10/50 ммМ., pH = 7.4) в присутствии функционализированных фенолов: **1** – **8**, **2** – тролокс, **3** – **9**, **4** – **10**, **5** – **12**, **6** – **11**, **7** – **6**, **8** – **13**.

увеличении его концентрации в системе. Метилирование гидроксильной группы в бензольном кольце фенолов **10** и **12** (см. продукты **11** и **13**) приводило к снижению активности.

Согласно полученным данным, исследованные аминифенолы и их производные в физиологически значимых условиях способны реагировать с нитрозил-радикалом и его интермедиатами. Следствием такого взаимодействия может являться образование нитрозо- и нитропроизводных. Взаиморасположение NH_2 - и OH -групп в бензольном кольце, наличие, положение и вид заместителей будут определять возможность С-, О- или N-нитрозирования (замещение атома Н в бензольном кольце, NH_2 - и OH -группах).

Образование конечных продуктов при взаимодействии аминифенолов и NO_x может реализовываться через различные механизмы. Один из возможных путей – это нитрозирование с участием промежуточных радикальных интермедиатов. Фенольные соединения (ArOH) могут подвергаться одноэлектронному окислению диоксидом азота с образованием феноксильных радикалов ($\text{ArO}^\bullet$) [50, 52]. Например, константа скорости реакции NO_2 с тирозином, гидрохиноном и тролоксом $\{E^\circ(\text{TxO}^\bullet, \text{H}^+/\text{TxOH}) = 0.48 \text{ В}$ [53] составляет $2.9 \cdot 10^7$, $\sim 10^8$ и $< 10^5$ ($\text{pH} = 6.6$)– $5 \cdot 10^8$ ($\text{pH} = 11.5$) $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно [34, 54, 55]. Образование С-нитропроизводных дофамина при его взаимодействии с NO/O_2 объясняют возможностью формирования семихинон-радикала $\text{Q}_0\text{H}^\bullet$ или $\text{Q}_0^\bullet$ (pK радикала $\text{Q}_0\text{H}^\bullet$ 5.9–6.45) [50, 56]. Последующее взаимодействие $\text{ArO}^\bullet$ с NO_2 и NO будет зависеть от структуры фенольного соединения и окружающих условий [50, 52, 57, 58].

С учетом свойств NO , окисление им фенольной OH -группы с образованием $\text{ArO}^\bullet$ представляется затруднительным [52]. Однако в работе [59] констатируют взаимодействие NO со стерически затрудненными фенольными антиоксидантами и токоферолом с образованием $\text{ArO}^\bullet$. Методом ЭПР показано, что в анаэробных условиях NO окисляет убихинолы Q_0H_2 и Q_2H_2 ($k = 0.49 \cdot 10^4$ и $1.6 \cdot 10^4$ $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно) [34], а также 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (но не дофамин) [60] с образованием семихинон-радикала и $\text{NO}^\bullet$. Следует отметить, что проблемой подобных исследований является полное элиминирование O_2 и, следовательно, высших оксидов азота из системы [52].

В работе [32] NO -акцепторную способность различных гидрофильных антиоксидантов, включая кофейную кислоту и тролокс, объясняют реализацией окислительно-восстановительных процессов, а не свободнорадикального механизма.

Другой механизм нитрозирования функционализированных фенолов базируется на том, что данные соединения подвергаются электрофильной атаке нитрозирующим агентом, в частности N_2O_3 , с образованием нитрозопроизводных, и последующем их окислении до нитросоединений [18, 56, 61].

Согласно полученным результатам все изомеры аминифенола **1–3** продемонстрировали способность снижать уровень NO_x . Следует полагать, учитывая отличия в структуре, что механизм их взаимодействия с NO , NO_2 и N_2O_3 будет различен. *мета*-Изомер аминифенола, который в отличие от *орто*- и *пара*-аминифенола не образует семихинон-радикалы, проявляет наибольший эффект. Для него характерна согласованная ориентация OH - и NH_2 -групп, активирующих электрофильное замещение в *орто*- и *пара*-положение бензольного кольца, что, очевидно, способствует С-нитрозированию. Для фенольных соединений показано [36, 61–63], что С-нитрозирование идет более активно в *пара*-положение к OH -группе, чем в *орто*-положение, что, вероятно, обуславливает меньшую активность аминифенола **3** в сравнении с аминифенолом **1**. В работе [36] для пирокатехина и гидрохинона детектировали продукты О- и С-нитрозирования, в то время как для резорцина только С-нитрозопродукты. Нельзя исключать возможность образования О-нитропродуктов для аминифенолов **1** и **3** через стадию образования семихинон-радикалов, что, конечно, требует дальнейших углубленных исследований.

Введение *трет*-бутильной группы в положение 4 аминифенола **1** не приводило к повышению его NO_x -акцепторной активности, однако наличие двух электронно-донорных групп в положениях 4 и 6 соединений **8** и **9** способствовало их эффективности. Согласно работе [64], алкилирование 2-аминифенола в положения 4 и 6 усиливало его способность акцептировать пероксильные радикалы.

Исходя из сравнения данных полученных для соединений **10–13**, гидроксильная группа важна для NO_x -акцепторной активности аминифенола. Согласно работе [65], вератрол (О-метилирован-

ный пирокатехин) в отличие от пирокатехина не снижает уровень NO. Ацетилирование фенольных групп куркумина снижало его NO-акцепторную способность [66], хотя в работе [67] для куркумина и диацетилкуркумина не наблюдали значительной разницы. Следует отметить, что соединения **10** и **12** проявляют противовирусную активность, которая пропадает при метилировании OH-группы [41, 68].

В аэробных условиях процессы, протекающие с аминифенолами могут быть более сложными. Соединения **1**, **3** и их производные могут окисляться молекулярным кислородом с образованием семихинон-радикала и $O_2^{\cdot-}$, который в присутствии NO трансформируется в $ONOO^-$ ($k = 1.9 \cdot 10^{10} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$), как постулируют это для дофамина [8, 50, 56]. Пероксинитрит, в свою очередь, способен окислять исходные субстраты [6, 7].

Известно [69–71], что алифатические и ароматические амины подвергаются N-нитрозированию, в случае первичных алифатических аминов (RNH_2) это приводит к их дезаминированию. Нитрозирование аминов посредством NO происходит в присутствии O_2 , в результате электрофильной атаки N_2O_3 [71], также вероятен радикальный механизм с участием $\cdot NO_2$ [72]. Например, константа скорости реакции анилина и о-метиланилина с N_2O_3 равна соответственно $7.5 \cdot 10^8$ и $4.8 \cdot 10^8 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ [70].

В условиях нашего эксперимента аминифенолы с первичной NH_2 -группой были более активны, чем N-замещенные производные. Наименьший эффект проявляют N-ацетилированные производные **4** и **5**. Согласно работе [73], трансформацию соединения **5** в N-(4-гидрокси-2-нитрофенил)ацетамид при pH = 7.4 наблюдали при инкубации с пероксинитритом или миелопероксидазой/ H_2O_2 / $NaNO_2$, однако в системах, основанных на таких донорах NO, как диэтиламин NONO-ат или спермин NONO-ат, данный продукт отсутствовал.

Слабый эффект убихинона Q_0 с увеличением его концентрации может быть обусловлен его взаимодействием с образующимся NO_2^- . В статье [74] показано, что электрохимически генерируемый о-бензохинон в водной среде (pH = 6.5) в реакции Михаэля реагирует с нитрит-анионом с образованием нитрокатехола.

В данной работе объектами исследования также были отдельные дипептиды (Tyr-Ala, Phen-Ala, β -Ala-

His и Gly-Gly), содержащие остатки ароматических, гетероциклической и простейших аминокислот. На рис. 3 и 4 представлены результаты исследования влияния указанных дипептидов и составляющих их аминокислот на уровень NO_x в тест-системе. Наибольшей активностью из дипептидов обладает Tyr-Ala ($IC_{50} = 5 \text{ мМ.}$) и он сравним по действию с аскорбиновой кислотой ($IC_{50} = 4.88 \text{ мМ.}$), выбранной в качестве стандарта. Надо отметить, что с увеличением концентрации Tyr-Ala ($>5 \text{ мМ.}$) его ингибирующий эффект не усиливался. Второй по эффективности был β -Ala-His ($IC_{50} = 35.0 \text{ мМ.}$). Остальные соединения сравнивали по их активности, которую они проявляют в концентрации 45 мМ., выбор которой определялся величиной IC_{50} триптофана. При данной дозе Phen-Ala ($IC_{50} > 50 \text{ мМ.}$), Phen, α -Ala и Trp снижают уровень NO_x на 29, 23, 16 и 50% соответственно. Свободный Tyr не был исследован вследствие его плохой растворимости в водной среде при pH = 7.4. В концентрации 45 мМ. His ($IC_{50} = 48.5 \text{ мМ.}$) и β -Ala ингибировали накопление NO_x на 47.5 и 7.5% соответственно, Gly-Gly ($IC_{50} > 50 \text{ мМ.}$) и Gly – на 35 и 22.5% соответственно. Активность свободных аминокислот убывала в следующем ряду: Trp > Phen $\geq$ Gly > α -Ala > β -Ala.

Известно [75], что комплексы аминокислот и пептидов с ионами металлов обладают различной биологической активностью, поэтому в работе также исследовали комплексы Gly и Gly-Gly с ио-

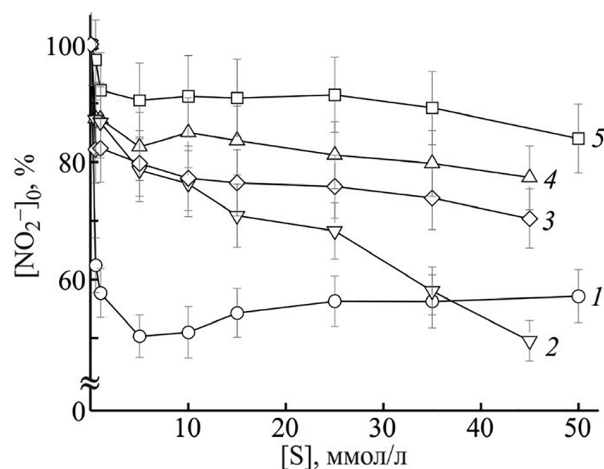


Рис. 3. Накопление нитрит-аниона в тест-системе нитропруссид натрия-PSB (10/10 мМ., pH = 7.4) в присутствии: 1 – Tyr-Ala, 2 – Trp, 3 – Phen-Ala, 4 – Phen, 5 – α -Ala.

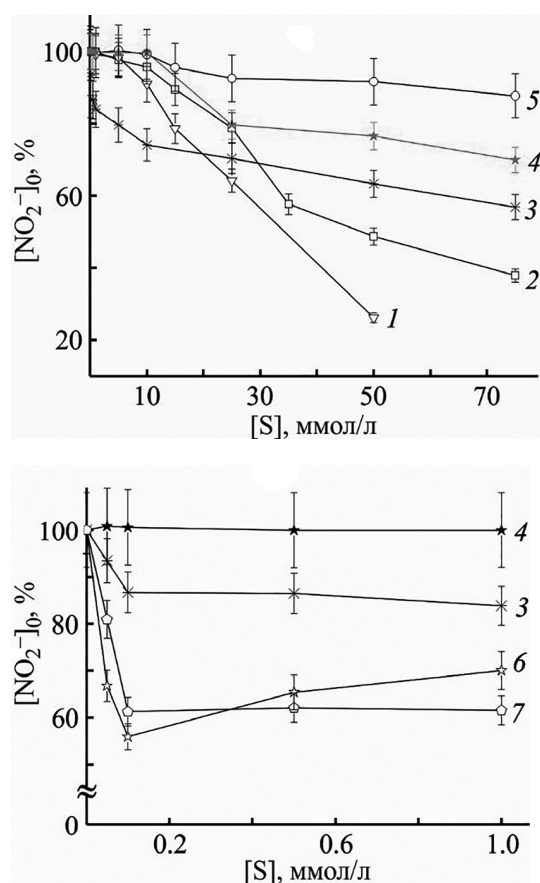


Рис. 4. Накопление нитрит-аниона в тест-системе нитропруссид натрия–PSB (10/10 мМ., pH = 7.4) в присутствии: 1 – Car, 2 – His, 3 – Gly-Gly, 4 – Gly, 5 – β -Ala, 6 – $(\text{Gly})_2\text{Cu}^{2+}$, 7 – $(\text{Gly-Gly})_2\text{Cu}^{2+}$.

нами меди(II). Согласно данным, представленным на рис. 4, комплексы $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и $\text{Cu}(\text{Gly-Gly})_2$ при низких концентрациях (0.05–0.5 мМ.) в 1.4–1.8 раз активнее в акцептировании NO_x , чем Gly и Gly-Gly.

Высокую NO_x -акцепторную активность Tyr-Ala обуславливает преимущественно наличие остатка Tyr. Известно [52], что Tyr и его производные эффективно нитрируются нитрозил-радикалом в присутствии кислорода, что вероятнее всего реализуется по радикальному механизму через образование тирозин-феноксильного радикала (Tyr^*). Взаимодействие Tyr^* с NO и NO_2 с образованием 3-нитротирозина протекает с высокой константой скорости $\sim 1.0 \cdot 10^9$ (pH = 7.4) и $3 \cdot 10^9$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ соответственно [58]. Меньшая эффективность Phen-Ala в сравнении с Tyr-Ala подтверждает важную роль фенольной

ОН-группы в способности данных дипептидов регулировать уровень NO_x .

β -Ala-His (карнозин) является важнейшим эндогенным дипептидом, обладающим антиоксидантной активностью [76]. Карнозин снижает повреждение клеток, вызванное окислительным/нитрозативным стрессом, регулируя уровень NO [77–79]. Исходя из полученных данных, His (pI = 7.59), содержащий остатки имидазола ($\text{pK}_a = 6.04$), обуславливает эффективность β -Ala-His в способности регулировать уровень NO_x . Полученные результаты согласуются с данными работы [77], где показано, что His более эффективен в акцептировании NO, чем β -Ala (донор NO: пропиламин-пропиламин NONOat). Методом масс-спектрометрии (электроспрей-ионизация) установлено [77, 79], что карнозин образует аддукты с NO.

Дипептиды проявляют большую NO_x -акцепторную активность, чем свободные аминокислоты, входящие в их состав. Такой синергический эффект аминокислот при их соединении амидной связью может быть обусловлен вкладом группы CONH во взаимодействие дипептидов с NO_x . Вторичный амин дипептидной связи может вступать в реакцию N-нитрозирирования и, тем самым, повышать способность дипептидов снижать уровень NO_x .

Комплексы $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и $\text{Cu}(\text{Gly-Gly})_2$ при низких дозах эффективнее, чем Gly и Gly-Gly, что можно объяснить взаимодействием NO с ионами Cu^{2+} . Известно [3], что NO реагирует с ионами переходных металлов, комплексы которых могут выступать эффективными акцепторами нитрозил-радикала. NO в водной среде способен восстанавливать ионы Cu^{2+} в ее комплексах [80]. Для понимания более детального механизма NO_x -акцепторной активности изученных соединений требуются более углубленные исследования.

ВЫВОДЫ

Таким образом, изомеры и производные 2-аминофенола, а также дипептиды Tyr-Ala, β -Ala-His, Phen-Ala и Gly-Gly обладают способностью регулировать уровень NO_x (NO , NO_2 , N_2O_3) при физиологически значимых условиях *in vitro*. Замена атома Н на CH_3 в ОН-группе аминифенолов снижает их эффективность, аминифенолы с немодифицированной NH_2 -группой обнаруживают большую активность, чем

N-замещенные. Дипептиды как NO_x -акцепторы более эффективны, чем входящие в их состав свободные аминокислоты. Комплексы $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и $\text{Cu}(\text{Gly-Gly})_2$ активнее, чем Gly и Gly-Gly. Полученные результаты исследования соотношения структура–активность могут быть полезны для создания эффективных антиоксидантов на основе производных аминифенолов и дипептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы: 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (тролокс, ТхОН), 4-(2-аминоэтил)-бензол-1,2-диол (дофамин), пиперазин, 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон (убихинон Q_0), β -аланилгистидин (β -Ala-His), β -аланин (β -Ala), L-гистидин (His), L-глицин (Gly), глицилглицин (Gly-Gly), нитропруссид натрия [натриевая соль пентацианонитрозил-фerrата(II), дигидрат], N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорид, сульфаниламид, тирозилаланин (Tyr-Ala), фенилаланилаланин (Phen-Ala), α -аланин (α -Ala), фенилаланин (Phen), триптофан (Trp), метанол (HPLC-grade), 2-аминофенол **1**, 3-аминофенол **2**, 4-аминофенол **3**, N-(2-гидроксифенил)ацетамид **4**, N-(4-гидроксифенил)ацетамид **5** (парацетамол), 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол **6** (ионол), 2-амино-4-*трет*-бутилфенол **7** производства фирмы «Sigma-Aldrich» (Германия). Аскорбиновая кислота, азид натрия, ортофосфорная кислота, нитрит натрия (ОСЧ), пероксид водорода (30%) получены от ЗАО «Вектон» (Россия). 2-Амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенол **8**, 2-амино-4,6-диизопропилфенол **9**, 2-анилино-4,6-ди-*трет*-бутилфенол **10** (бутаминофен), 3,5-ди-*трет*-бутил-2-метокси-N-фениланилин **11**, N-(2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид **12** и N-(2-метокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид **13** синтезированы по ранее описанным методикам [68, 81, 82]. Синтез комплексов глицина с ионами меди описан в работе [83]. Все использованные в работе реактивы имели аналитическую степень чистоты.

Исходные растворы аминокислот и их производных готовили в деионизированной воде, производных фенолов – в метаноле. Фосфатно-солевой буфер (PSB) (50 мМ., pH = 7.4) готовили с использованием следующих солей: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl и KCl, необходимую величину pH достигали прибавлением

растворов HCl или NaOH. Показатель pH контролировали с помощью милливольтметра pH марки HI 9321, используя комбинированный электрод HI 1131 или HI 1083. Калибровку pH-метра осуществляли в день проведения испытаний по стандартным буферным растворам (pH = 4.00 ± 0.01 , 10.00 ± 0.01). В день анализа исходный раствор нитропруссид натрия (100 мМ.) готовили путем растворения твердой соли в 10 или 50 мМ. PSB, предварительно продутом аргоном в течение 1 ч для удаления кислорода. Полученный раствор нитропруссид натрия также продували аргоном и хранили в темной склянке, обернутой алюминиевой фольгой. Для тест-системы отбирали аликвоту (100 мкл) исходного раствора нитропруссид натрия. Исходный 100 мМ. раствор нитрита натрия готовили путем растворения 69 мг NaNO_2 в 10 мл деионизированной воды.

Генерирование нитрозил-радикала и его активных форм. Тест-система представляет собой аэробную водную среду и имеет следующий состав: нитропруссид натрия (10 мМ.)–PSB (10 либо 50 мМ., pH = 7.4). Общий объем реакционной системы составляет 1 мл. Для изучения NO_x -активности соединений готовили их концентрированные растворы, а затем рассчитанные аликвоты добавляли в тест-систему. В контрольную систему параллельно вводили соответствующие аликвоты растворителей, использованные для приготовления растворов соединений. Реагенты после каждого добавления тщательно перемешивали с помощью прибора Vortex mixer и инкубировали при комнатной температуре в течение 120 мин при стандартизированном искусственном освещении (светодиодная лампа дневного света). Образование $\cdot\text{NO}$ и его активных форм (NO_2 , N_2O_3) в тест-системе определяли по уровню нитрит-аниона, стабильного продукта автоокисления нитрозил-радикала в аэробной водной среде.

Исследование NO_x -активности соединений [S] базируется на методе конкурентных реакций. Они могут конкурировать с O_2 за $\cdot\text{NO}$, или реагировать с промежуточными продуктами его автоокисления (NO_2 , N_2O_3), и, тем самым, препятствовать протеканию реакций (1–3). В результате в присутствии соединений, активных в отношении $\cdot\text{NO}$, NO_2 и N_2O_3 , кроме процессов (1–3) могут протекать реакции (4–6), изображенные на схеме 3.

Схема 3.

Активность тестируемых соединений (S) в отношении NO_x оценивали по изменению концентрации нитрит-аниона в тест-системе в их присутствии в сравнении с контролем (%). Количество NO_2^- в контрольной тест-системе, не содержащей исследуемых соединений, принято за 100%. Для определения индекса полунгибирования IC_{50} (мМ.) строили зависимости ингибирование (I , %)–концентрация (S , мМ.). Процент ингибирования рассчитывали по следующей формуле:

$$I (\%) = \{(A_k - A_{\text{иссл}})/A_k\} \times 100,$$

где A_k и $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность контрольной (содержит все реагенты, кроме тестируемого соединения) и исследуемой (добавлено тестируемое соединение) систем соответственно. В качестве соединений сравнения использованы тролокс и аскорбиновая кислота ($\text{pK}_{a1} = 4.1$, $\text{pK}_{a2} = 11.8$, при $\text{pH} = 7.4$ преимущественно моноанион AscH^-). Аскорбиновая кислота может реагировать с NO , NO_2 ($1.8 \cdot 10^7$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$, $\text{pH} = 6.5$) и N_2O_3 [84, 85]. Тролокс взаимодействует с NO ($3.76 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$) и NO_2 [32].

Для выявления возможностей тест-системы тестировали NaN_3 , пиперазин, дофамин и H_2O_2 , которые различным образом реагируют с $\cdot\text{NO}$ и его активными формами. H_2O_2 может окислять $\cdot\text{NO}$ ($2.5 \cdot 10^5$ и $8.4 \cdot 10^5$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ соответственно при 15 и 30°C) и NO_2 до нитрат-аниона [44, 45]. Азид натрия не взаимодействует с нитрозил-радикалом непосредственно, однако является эффективным акцептором N_2O_3 ($2 \cdot 10^9$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$) [46]. Вторичный амин пиперазин ($\text{pK}_{a1} = 9.73$, $\text{pK}_{a2} = 5.35$) также эффективно реагирует с N_2O_3 ($\sim 1.3 \cdot 10^8$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$) [47] с образованием нитрозоаминов (N-мононитрозопиперазин и N,N'-динитрозопиперазин) [48]. Дофамин, производное пирокатехина (при физиологическом pH протонирован по NH_2 -группе), реагирует с NO и NO_2 в аэрированных водных растворах [18, 49]. В отсутствие O_2 значимого взаимодействия

дофамина с NO не наблюдали [50]. Все указанные соединения, включая стандартные TxOH и AscH^- , концентрационно-зависимым образом ингибируют накопление нитрит-аниона, уровень NO_2^- снижается с увеличением их количества в тест-системе в сравнении с контролем. Полученные величины IC_{50} составили: дофамин – 0.045, NaN_3 – 0.1, пиперазин – 0.115, H_2O_2 – 7.55, тролокс – 0.19, Asc – 4.88 мМ.

Определение нитрит-ионов в тест-системе.

Нитрит-ионы (NO_2^-) определяли по модифицированной методике, изложенной в работах [86, 87], базирующейся на реакции Грисса. Для оптимального детектирования NO_2^- использовали модифицированный реактив Грисса, состоящий из двух реагентов – сульфаниламида (SA) и N-(1-нафтил)этилендиамина (NED). По истечении времени инкубирования в тест-систему (1 мл) на первом этапе вводили 0.5 мл раствора SA (1%-ный раствор в 5%-ной H_3PO_4) и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. В результате диазотирования SA в кислой среде образуется диазоний-катион. На втором этапе добавляли 0.5 мл раствора NED (0.1%-ный раствор в деионизированной воде) и инкубировали тест-систему при комнатной температуре в течение 10 мин. NED реагирует с диазоний-катионом с образованием соединения, содержащего азогруппу $\text{N}=\text{N}$. Результирующий продукт, имеющий розово-красную окраску, детектировали по его абсорбции при 540 нм (30000 л·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$) с помощью спектрофлуориметра CM 2203 (Солар, Беларусь) в режиме «спектрофотометрия».

Для количественной оценки содержания NO_2^- применяли метод градуировочного графика. Для приготовления калибровочных растворов в диапазоне концентраций 1–100 мкМ. использовали нитрит натрия. Концентрацию NO_2^- рассчитывали из уравнения линейной регрессии.

Статистический анализ. Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая статистические функции программ Excel и Origin. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью t -теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3–7 раз параллельных опытов. На рисунках каждый результат представлен как среднее значение $\pm$ SD, статистически отличное в сравнении с контролем ($p < 0.05$).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной научно-технической программы Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» (проект 2.2.03.04) и Министерства образования Республики Беларусь (грант 809/46).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrabi S.M., Sharma N.S., Karan A., Shahriar S.M.S., Cordon B., Ma B., Xie J. // *Adv. Sci.* 2023. Vol. 10. P. 2303259. doi 10.1002/adv.202303259
2. Heinrich T.A., da Silva R.S., Miranda K.M., Switzer C.H., Wink D.A., Fukuto J.M. // *Br. J. Pharmacol.* 2013. Vol. 169. P. 1417. doi 10.1111/bph.12217
3. Fricker S.P. in: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* / Ed. R.A. Scott. John Wiley & Sons, Ltd., 2019. P. 1. doi 10.1002/9781119951438.eibc2724
4. Hughes M.N. // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1999. Vol. 1411. P. 263. doi 10.1016/s0005-2728(99)00019-5
5. Bartberger M.D., Liu W., Ford E., Miranda K.M., Switzer C., Fukuto J.M., Houk K.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. P. 10958. doi 10.1073/pnas.162095599
6. Koppenol W.H. // *Free Rad. Biol. Med.* 1998. Vol. 25. P. 385. doi 10.1016/s0891-5849(98)00093-8
7. Ford P.C., Miranda K.M. // *Nitric oxide.* 2020. Vol. 103. P. 31. doi 10.1016/j.niox.2020.07.004
8. Reiter T.A. // *Redox Report.* 2006. Vol. 11. P. 194. doi 10.1179/135100006X116718
9. Ridnour L.A., Thomas D.D., Mancardi D., Espey M.G., Miranda K.M., Paolocci N., Wink D.A. // *Biol. Chem.* 2004. Vol. 385. P. 1. doi 10.1515/bc.2004.001
10. Wink D.A., Mitchell J.B. // *Free Rad. Biol. Med.* 1998. Vol. 25. P. 434. doi 10.1016/s0891-5849(98)00092-6
11. Lancaster J.R. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. Vol. 19. P. 1160. doi 10.1021/tx060061w
12. Lam M.A., Pattison D.I., Bottle S.E., Keddle D.J., Davies M.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. Vol. 21. P. 2111. doi 10.1021/tx800183t
13. Fedeli D., Damiani E., Greci L., Littarru G.P., Falcioni G. // *Mutat. Res.* 2003. Vol. 535. P. 117. doi 10.1016/s1383-5718(02)00296-6
14. Shama J.N., Al-Omran A., Parvathy S.S. // *Inflammopharmacology.* 2007. Vol. 15. P. 252. doi 10.1007/s10787-007-0013-x
15. Aliev G., Palacios H.H., Lipsitt A.E. // *Neurotoxic. Res.* 2009. Vol. 16. P. 293. doi 10.1007/s12640-009-9066-5
16. Huie R.E. // *Toxicology.* 1994. Vol. 89. P. 193. doi org/10.1016/0300-483X(94)90098-1
17. Nedospasov A.A. // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2002. Vol. 16. P. 109. doi 10.1002/jbt.10029
18. D'Ischia M. // *C. R. Chim.* 2005. Vol. 8. P. 797. doi 10.1016/j.crci.2005.02.008
19. Goldstein S., Czapski G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. Vol. 117. P. 12078. doi 10.1021/ja00154a007
20. Wardman P. // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1989. Vol. 18. P. 1637. doi 10.1063/1.555843
21. Andrés C.M.C., Pérez de la Lastra J.M., Juan C.A., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. P. 14049. doi org/10.3390/ijms232214049
22. Kuo W.N., Ivy D., Guruvadoo L., White A., Graham L. // *Front. Biosci.* 2004. Vol. 9. P. 3163. doi 10.2741/1469.
23. Jin H.J., Lee J.H., Kim D.H., Kim K.-T., Lee G.W., Choi S.J., Paik H.-D. // 2015. Vol. 24. P. 1555. doi 10.1007/s10068-015-0200-2
24. Kangsanant S., Thongraung C., Jansakul C., Murkovic M., Seechamnaturakit V. // *Intern. J. Food Sci. Technol.* 2014. Vol. 50. P. 660. doi 10.1111/ijfs.12680
25. Ghanbari R., Ebrahimpour A., Zare M., Ismail A., Abdul-Hamid A., Saari N. // *Food Biotech.* 2016. Vol. 30. P. 263. doi 10.1080/08905436.2016.1234391
26. Saisavoey T., Sangtanoo P., Reamtong O., Karnchanatat A. // *J. Sci. Food Agric.* 2019. Vol. 99. P. 5112. doi org/10.1002/jsfa.9755
27. Ozawa H., Miyazawa T., Burdeos G.C., Miyazawa T.J. // *Nutr. Sci. Vitaminol.* 2022. Vol. 68. P. 162. doi 10.3177/jnsv.68.162.
28. Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B. // *Curr. Pharm. Des.* 2018. Vol. 24. P. 3020. doi 10.2174/1381612824666181008105641
29. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалицева Н.В. Репольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия: монография. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 496 с.
30. Floris B., Galloni P., Conte V., Sabuzi F. // *Biomolecules.* 2021. Vol. 11. P. 1325. doi 10.3390/biom11091325
31. Kruk J., Aboul-Enein B.H., Duchnik E., Marchlewicz M. // *J. Physiol. Sci.* 2022. Vol. 72. P. 19. doi org/10.1186/s12576-022-00845-1
32. Sueishi Y., Hori M., Kita M., Kotake Y. // *Food Chem.* 2011. Vol. 129. P. 866. doi 10.1016/j.foodchem.2011.05
33. Sueishi Y., Hori M. // *Nitric Oxide.* 2013. Vol. 29. P. 25. doi 10.1016/j.niox.2012.12.002
34. Poderoso J.J., Carreras M.C., Schöpfer F., Lisdero C.L., Riobó N.A., Giulivi C., Cadenas E. // *Free Rad. Biol. Med.* 1999. Vol. 26. P. 925. doi 10.1016/s0891-5849(98)00277-9

35. Duarte J., Francisco V., Perez-Vizcaino F. // Food Funct. 2014. Vol. 5. P. 1653. doi 10.1039/c4fo00144c
36. Lu Y., Dong Y., Li X., He Q. // J. Food Sci. 2016. Vol. 81. P. C2692. doi 10.1111/1750-3841.13535
37. Буравлев Е.В., Шевченко О.Г. // Изв. АН. Сер. хим. 2022. Т. 71. № 12. С. 2621; Buravlev E., Shevchenko O. // Rus. Chem. Bull. 2022. Vol. 71. P. 2621. doi 10.1007/s11172-022-3691-z
38. Takahashi N., Ohba T., Yamauchi T., Higashiyama K. // Bioorg. Med. Chem. 2006. Vol. 14. P. 6089. doi 10.1016/j.bmc.2006.05.013
39. Ксендзова Г.А., Сорокин В.Л., Едимечева И.П., Шадыро О.И. // Химия высоких энергий. 2004. Т. 37. С. 411.
40. Ksendzova G.A., Sorokin V.L., Edimecheva I.P., Shadyro O.I. // Free Rad. Res. 2004. Vol. 38. P. 1183. doi 10.1080/10715760400016162
41. Shadyro O.I., Ksendzova G.A., Polozov G.I., Sorokin V.L., Boreko E.I., Savinova O.V., Dubovik B.V., Bizunok N.A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. Vol. 18. N 7. P. 2420. doi 10.1016/j.bmcl.2008.02.055
42. Shishido S.M., de Oliveira G. // Prog. React. Kinet. 2001. Vol. 26. P. 239. doi 10.3184/007967401103165271
43. Crespo P.M., Odio O.F., Ávila Y., Perez-Cappe E., Reguera E. // J. Photochem. Photobiol. (A). 2021. Vol. 412. P. 113244. doi 10.1016/j.jphotochem.2021.113
44. Baveja K.K., Subba-Rao D., Sankar K. // J. Chem. Eng. Japan. 1979. Vol. 12. P. 322.
45. Bhanarkar A.D., Gupta R.K., Biniwale R.B., Tamhane S.M. // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2014. Vol. 11. P. 1537. doi 10.1007/s13762-013-0295-z
46. Wink D.A., Darbyshire J.F., Nims R.W., Saavedra J.E., Ford P.C. // Chem. Res. Toxicol. 1993. Vol. 6. P. 23. doi 10.1021/tx00031a003.
47. Da Silva G., Kennedy E., Dlugogorski B. // J. Chem. Res. 2002. Vol. 2002. P. 589. doi 10.3184/030823402103171069
48. Bellander B.T., Hagmar L., Osterdahl B.G. // IARC Sci. Publ. 1984. Vol. 57. P. 171.
49. De la Bretèche M.-L., Servy C., Lenfant M., Ducrocq C. // Tetrahedron Lett. 1994. Vol. 35. P. 7231. doi 10.1016/0040-4039(94)85368-1
50. Rettori D., Tang Y., Dias L. C., Cadenas E. // Free Rad. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 685. doi 10.1016/s0891-5849(02)00953-x
51. Шадыро О.И., Сорокин В.Л., Ксендзова Г.А., Савинова О.В., Самович С.Н., Бореко Е.И. // Хим.-фарм. ж. 2019. Т. 53. № 7. С. 45; Shadyro O.I., Sorokin V.L., Ksendzova G.A., Savinova O.V., Samovich S.N., Boreko E.I. // Pharm. Chem. J. 2019. Vol. 53. N 7. P. 646. doi 10.1007/s11094-019-02055-3
52. Giorgini E., Petrucci R., Astolfi P., Mason R.P., Greci L. // Eur. J. Org. Chem. 2002. Vol. 23. P. 4011. doi 10.1002/1099-0690(200212)2002:23<4011::aid-ejoc4011>3.0.co;2-6
53. Indira Priyadarsini K., Kapoor S., Naik D.B. // Chem. Res. Toxicol. 2001. Vol. 14. P. 567. doi org/10.1021/tx000239t
54. Alfassi Z.B. // Int. J. Radiat. Appl. Instrum. (C). 1987. Vol. 29. P. 405. doi org/10.1016/1359-0197(87)90014-2
55. Davies M.J., Forni L.G., Willson R.L. // Biochem. J. 1988. Vol. 255. P. 513.
56. Antunes F., Nunes C., Laranjinha J., Cadenas E. // Toxicology. 2005. Vol. 208. P. 207. doi 10.1016/j.tox.2004.11.033
57. Rubbo H., Radi R., Anselmi D., Kirk M., Barnes S., Butler J., Freeman B.A. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 10812. doi 10.1074/jbc.275.15.10812
58. Eiserich J.P., Butler J., van der Vliet A., Cross C.E., Halliwell B. // Biochem. J. 1995. Vol. 310. P. 745. doi 10.1042/bj3100745
59. Janzen E.G., Wilcox A.L., Manoharan V. // J. Org. Chem. 1993. Vol. 58. P. 3597. doi 10.1021/jo00066a001
60. Laranjinha J., Cadenas E. // J. Neurochem. 2002. Vol. 81. P. 892. doi 10.1046/j.1471-4159.2002.00900.x
61. González-Mancebo S., García-Santos M.P., Hernández-Benito J., Calle E., Casado J. // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 2235. doi 10.1021/jf981094n
62. Vione D., Maurino V., Pelizzetti E., Minero C. // Intern. J. Environ. Anal. Chem. 2004. Vol. 84. P. 493. doi 10.1080/03067310310001640447
63. Williams D.L.H. Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide. Amsterdam: Elsevier, 2004. P. 93. doi 10.1016/B978-044451721-0/50006-2
64. Endo Y., Murayama M., Ogawa F., Nishiyama T. // Technol. Rep. Kansai Univ. 2005. Vol. 47. P. 31.
65. D'Ischia M., Costantin C. // Bioorg. Med. Chem. 1995. Vol. 3. P. 923. doi 10.1016/0968-0896(95)00083-s
66. Sumanont Y., Murakami Y., Tohda M., Vajragupta O., Matsumoto K., Watanabe H. // Biol. Pharm. Bull. 2004. Vol. 27. P. 170. doi 10.1248/bpb.27.170
67. Sreejayan Rao M.N.A. // J. Pharm. Pharmacol. 1997. Vol. 49. P. 105. doi 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06761.x
68. Шадыро О.И., Сорокин В.Л., Ксендзова Г.А., Павлова Н.И., Савинова О.В., Бореко Е.И. // Хим.-фарм. ж. 2012. Т. 46. № 7. С. 27; Shadyro O.I., Sorokin V.L., Ksendzova G.A., Savinova O.V., Pavlova N.I., Boreko E.I. // Pharm. Chem. J. 2012. Vol. 46. N 7. P. 414. doi 10.30906/0023-1134-2012-46-7-27-30
69. Wainwright T. // J. Ins. Brew. 1986. Vol. 92. P. 49. doi 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04373.x
70. Da Silva G., Kennedy E.M., Dlugogorski B.Z. // J. Phys. Org. Chem. 2007. Vol. 20. P. 167. doi 10.1002/poc.1142
71. Itoh T., Matsuy Y., Maeta H., Miyazaki M., Nagata K., Ohsawa A. // Chem. Pharm. Bull. 1999. Vol. 47. P. 819. doi 10.1248/cpb.47.819
72. Zhao Y.-L., Garrison S.L., Gonzalez C., Thweatt W.D., Marquez M. // J. Phys. Chem. (A). 2007. Vol. 111. P. 2200. doi 10.1021/jp0677703

73. Lakshmi V.M., Hsu F.F., Davis B.B., Zenser T.V. // Chem. Res. Toxicol. 2000. Vol. 13. P. 891. doi 10.1021/tx000115g
74. Nematollahi D., Ariapad A., Rafiee M. // J. Electroanal. Chem. 2007. Vol. 602. P. 37. doi 10.1016/j.jelechem.2006.11.0
75. Marinova P., Tamahkyarova K. // BioTech. 2024. Vol. 13. P. 9. doi 10.3390/biotech13020009
76. Шендикова Е.Н., Мельситова И.В., Юркова И.Л. // Химия высоких энергий. 2016. Т. 50. № 4. С. 260; Shendikova E.N., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L. // High Energy Chem. 2016. Vol. 50. N 4. P. 249. doi 10.1134/S0018143916040172
77. Nicoletti V.G., Santoro A.M., Grasso G., Vagliasindi L.I., Giuffrida M.L., Cuppari C., Purrello V.S., Stella A.M., Rizzarelli E. // J. Neurosci. Res. 2007. Vol. 85. P. 2239. doi 10.1002/jnr.21365
78. Fleisher-Berkovich S., Abramovitch-Dahan C., Ben-Shabat S., Apte R., Beit-Yannai E. // Peptides, 2009. Vol. 30. P. 1306. doi 10.1016/j.peptides.2009.04.003
79. Caruso G., Fresta C.G., Martinez-Becerra F., Antonio L., Johnson R.T., de Campos R.P.S., Siegel J.M., Wijesinghe M.B., Lazzarino G., Lunte S.M. // Mol. Cell. Biochem. 2017. Vol. 431. P. 197. doi org/10.1007/s11010-017-2991-3
80. Ford P.C., Fernandez B.O., Lim M.D. // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 2439. doi 10.1021/cr0307289
81. Houben-Weyl. // Methoden der organischen chemie. 1960. Vol. 6. P. 927.
82. Вольева В.Б., Прокофьева Т.И., Прокофьев А.М., Белостоцкая И.С., Комисарова Н.Л., Ершов В.В. // Изв. АН. Сер. хим. 1995. № 9. С. 1789.
83. Милач О.А., Найденов В.Э., Каранкевич Е.Г., Юркова И.Л. // ЖОХ. 2022. Т. 92. № 2. С. 277; Milach O.A., Naidenov V.E., Karankevic E.G., Yurkova I.L. // Russ. J. Gen. Chem. 2022. Vol. 92. N 2. P. 241. doi 10.1134/S107036322202013X
84. Myshkin A.E., Konyaeva V.S., Gumargalieva K.Z., Moiseev Y.V. // J. Agric. Food Chem. 1996. Vol. 44. P. 2948. doi 10.1021/jf940643w
85. Li T., Guo G.J., Hu M., Yao M.J. // Adv. Mater. Res. 2011. Vol. 343–344. P. 862. doi 10.4028/www.scientific.net/amr.343-344.862
86. Bratton A.C., Marshall E.K. // J. Biol. Chem. 1939. Vol. 128. P. 537. doi 10.1016/S0021-9258(18)73708-3
87. Verdon C.P., Burton B.A., Prior R.L. // Anal. Biochem. 1995. Vol. 224. P. 502. doi 10.1006/abio.1995.1079
88. Giustarini D., Dalle-Donne I., Colombo R., Milzani A., Rossi R. // Free Rad. Res. 2004. Vol. 38. P. 1235. doi 10.1080/10715760400017327

Effect of Aminophenol and Amino Acids Derivatives on the Level of Nitrosyl Radical and Its Active Forms *In Vitro*

E. M. Ovsyannikova¹, A. A. Burko¹, G. A. Ksendzova², V. L. Sorokin¹,
E. G. Karankevich³, and I. L. Yurkova^{1,2,*}

¹ Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

² Research Institute of Physicochemical Problems, Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

³ Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

*e-mail: yurkovail@tut.by

Received July 15, 2024; revised September 3, 2024; accepted September 4, 2024

The effect of aminophenol, amino acids and their derivatives on the level of $\cdot\text{NO}$ and its intermediates ($\cdot\text{NO}_2$, N_2O_3) in an aqueous aerobic media (pH = 7.4) was studied using nitroprusside as a $\cdot\text{NO}$ donor. It was found that the highest NO_x scavenging activity is exhibited by 3-aminophenol ($\text{IC}_{50} = 0.11$ mM), 2-aminophenol ($\text{IC}_{50} = 0.195$ mM) and 4,6-di-*tert*-butyl-2-aminophenol ($\text{IC}_{50} = 0.12$ mM), standards: trolox ($\text{IC}_{50} = 0.19$ mM) and ascorbate ($\text{IC}_{50} = 4.88$ mM). Methylation of the OH group reduced the effectiveness of aminophenol. In the studied concentration range (0–70 mM), Tyr-Ala ($\text{IC}_{50} = 5.0$ mM) and β -Ala-His ($\text{IC}_{50} = 35.0$ mM) were more active than Phe-Ala ($\text{IC}_{50} > 50$ mM) and Gly-Gly ($\text{IC}_{50} > 50$ mM). Complexes $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ and $\text{Cu}(\text{Gly-Gly})_2$ at low concentrations (0.05–0.5 mM) are 1.4–1.8 times more effective than Gly and Gly-Gly.

Keywords: nitrosyl radical, reactive nitrogen species, aminophenol derivatives, dipeptide, Cu(II)-dipeptide complex