

УДК 577.29



ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ D-МЕТАЛЛОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ, АГРЕГАЦИЮ И АМИЛОИДНУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ АЛЬБУМИНА В РЕАКЦИИ ГЛИКИРОВАНИЯ

Р.А. Литвинов^{1,2}, А.В. Гонтарева¹, Л.Э. Усмьянова¹, Д.Р. Клименко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

² Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Получено 13.05.2021

Принята к печати 22.08.2021

Цель. Исследование влияния фактора протекания реакции гликирования бычьего сывороточного альбумина (БСА) глюкозой и фактора присутствия в среде реакции гликирования катионов d-металлов (никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) или цинк (II)) на процесс агрегации и амилоидной трансформации БСА. Установление влияния указанных катионов на интенсивность образования конечных продуктов реакции гликирования (КПГ) и интенсивность флуоресценции аминокислот тирозин и триптофан.

Материалы и методы. Реагенты в реакции гликирования: глюкоза (в конечной концентрации 0,36 М), БСА (в конечной концентрации 1 мг/мл), деионизированная вода, один из катионов d-металлов, а именно никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) или цинк (II) (в виде соли хлорида, сульфата или нитрата, в конечной концентрации 40 мкМ). Условия протекания реакции гликирования: инкубация 24 ч при температуре 60°C. Исследовано влияние двух факторов (фактор протекания гликирования и фактор присутствия иона d-металла в реакционной среде) на концентрацию КПГ, образуемых в ходе реакции гликирования, на интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, на агрегацию БСА и на способность БСА к амилоидной трансформации в описанных условиях.

Результаты. Установлено, что исследуемые факторы статистически значимо влияют на рассматриваемые параметры. Наивысшая активность установлена для иона меди (II), который интенсифицирует образование КПГ в пробах, где протекает гликирование, снижает интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин (самостоятельно и усиливая эффект на фоне гликирования), вызывает амилоидную трансформацию БСА (самостоятельно и усиливая эффект на фоне гликирования). Наименее выражены перечисленные эффекты были в реакционных средах с добавлением никеля (II) или кобальта (II). Данные катионы снижают интенсивность образования КПГ, не вызывают образования белковых агрегатов. В присутствии глюкозы никель (II) слабо подавляет интенсивность флуоресценции триптофана и тирозина, незначительно усиливает амилоидную трансформацию БСА. Кобальт (II) незначительно подавляет амилоидную трансформацию БСА. Катионы железа (II), железа (III) и цинка (II) по выраженности и характеру эффектов занимают промежуточное положение между медью (II) с одной стороны, и никелем (II) и кобальтом (II) с другой стороны, в разной степени сочетая влияние на образование КПГ, интенсивность флуоресценции триптофана и тирозина, агрегацию и амилоидную трансформацию БСА. В отсутствие глюкозы способность цинка (II) вызывать образование белковых агрегатов оказалась наивысшей, а его способность стимулировать амилоидную трансформацию БСА соответствовала таковой у меди (II).

Заключение. Присутствие катионов d-металлов влияет на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования, влияет на интенсивность амилоидной трансформации БСА и на образование агрегатов белка. В ряду таких ионов, как никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) и цинк (II), ионы меди (II) оказались наиболее активными по способности ускорять образование КПГ, подавлять флуоресценцию триптофана и тирозина, усиливать агрегацию и амилоидную трансформацию БСА в реакции гликирования. Наименьшая выраженность указанных свойств отмечается для ионов никеля (II) и кобальта (II).

Ключевые слова: конечные продукты гликирования; гликирование; агрегация белка; амилоидная трансформация; d-металл

Список сокращений: КПГ – конечные продукты гликирования; БСА – бычий сывороточный альбумин; РКПГ – рецептор к конечным продуктам гликирования; ThT – тиофлавин Т

Для цитирования: Р.А. Литвинов, А.В. Гонтарева, Л.Э. Усмьянова, Д.Р. Клименко. Влияние некоторых d-металлов на образование конечных продуктов гликирования, агрегацию и амилоидную трансформацию альбумина в реакции гликирования. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):306-317. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-306-317

© Р.А. Литвинов, А.В. Гонтарева, Л.Э. Усмьянова, Д.Р. Клименко, 2021

For citation: R.A. Litvinov, A.V. Gontareva, L.E. Usmyanova, D.R. Klimenko. Influence of certain d-metals on formation of advanced glycation end products, aggregation and amyloid transformation of albumin in glycation reaction. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):306-317. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-306-317

INFLUENCE OF CERTAIN D-METALS ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS, AGGREGATION AND AMYLOID TRANSFORMATION OF ALBUMIN IN GLYCATION REACTION

R.A. Litvinov^{1,2}, A.V. Gontareva¹, L.E. Usmiyanova¹, D.R. Klimenko¹

¹ Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Volgograd Medical Research Center,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: litvinov.volgmgmu@mail.ru

Received 13 May 2021

Accepted 22 Aug 2021

The aim of the research is to investigate the influence of the factor of the glycation behavior of bovine serum albumin (BSA) by glucose, and the factor of d-metal cations (nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) or zinc (II)) presence, on the process of aggregation and the amyloid transformation of BSA and, therefore, to establish the effect of these cations on the rate of the formation of advanced glycation end products (AGEs), and the intensity of fluorescence of the amino acids tyrosine and tryptophan.

Materials and methods. Reagents in the glycation are: glucose (at the final concentration of 0.36 M), BSA (at the final concentration of 1 mg/ml), deionized water, one of the d-metal cations, i. e. nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) or zinc (II) (in the form of chloride, sulfate or nitrate salts, at the final concentration of 40 μM). The conditions for the glycation reaction are the incubation for 24 hours at the temperature of 60°C. The influence of two factors (the factor of the glycation reaction and the factor of a d-metal ion presence in the reaction medium) on the concentration of glycation end products (AGEs) formed during the glycation reaction, on the fluorescence intensity of the amino acids tryptophan and tyrosine, on the aggregation of BSA, and on the ability of BSA to the amyloid transformation under the described conditions, have been studied.

Results. It was found out that the studied factors have a statistically significant effect on the considered parameters. The highest activity was found for the copper ion (II), which intensifies the formation of the AGEs in the samples where glycation occurs, reduces the fluorescence intensity of the amino acids' tryptophan and tyrosine (independently and increasing the effect against the background of glycation). Besides, it independently causes the aggregation of BSA hereby intensifying the effect against the background of glycation, it independently causes the amyloid transformation of BSA enhancing the effect against the background of glycation. The above-listed effects were the least pronounced in the reaction media with the addition of nickel (II) or cobalt (II). These cations reduce the rate of the AGEs formation, do not cause the formation of protein aggregates. In the presence of glucose, nickel (II) weakly suppresses the fluorescence intensity of tryptophan and tyrosine, and slightly enhances the amyloid transformation of BSA. Cobalt (II) slightly inhibits the amyloid transformation of BSA. In terms of the severity and nature of the effects, the iron (II), iron (III) and zinc (II) cations occupy an intermediate position between copper (II), on the one hand, and nickel (II) and cobalt (II), on the other hand, combining the influence on the AGEs formation, the intensity of fluorescence of tryptophan and tyrosine, the aggregation and amyloid transformation of BSA. In the absence of glucose, the ability of zinc (II) to induce the formation of protein aggregates turned out to be the highest, and its ability to stimulate the amyloid transformation of BSA corresponded to that of copper (II).

Conclusion. The presence of d-metal cations affects the rate of the AGEs formation in the glycation reaction, affects the rate of the BSA amyloid transformation and the protein aggregates formation. Among such ions as nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) and zinc (II), copper (II) ions turned out to be the most active in their ability to accelerate the AGEs formation, suppress the fluorescence of tryptophan and tyrosine, enhance the aggregation and amyloid transformation of BSA in the glycation reaction. The least manifestation of these properties is observed for nickel (II) and cobalt (II) ions.

Keywords: advanced glycation end products; glycation; protein aggregation; amyloid transformation, d-metal

Abbreviations: AGEs – advanced glycation end products; BSA – bovine serum albumin; RAGEs – Receptor for advanced glycation end products; ThT – thioflavine T

ВВЕДЕНИЕ

Неферментативное гликирование служит источником образования токсичных конечных продуктов гликирования (КПГ). КПГ представляют собой группу молекул числом более 20 [1, 2], различных по своим свойствам, включая способность к аутофлуоресценции и образованию поперечных сшивок. КПГ являются важными патогенетическими факторами развития когнитивных нарушений (диабетическая энцефалопатия,

конформационные болезни мозга) [3–6]. Структуры некоторых КПГ представлены на рисунке 1.

КПГ вовлечены в патогенез когнитивных нарушений с помощью различных механизмов. В культуре гиппокампальных нейронов КПГ вызывали апоптоз, повышали продукцию проапоптотического белка Вах и ацетилхолинэстеразы, снижали уровень антиапоптотического белка Bcl-2, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и холинацетилтрансферазы, уве-

личивали концентрацию малонового диальдегида и др. [7]. КПП способны активировать рецептор к КПП (РКПП). Предполагается, что РКПП связывает патогены сахарного диабета и болезни Альцгеймера [8]. РКПП может быть активирован белком Аβ [9] и принимает участие в его интранейрональном транспорте из крови [10]. Активация РКПП может приводить к развитию нейронального окислительного стресса [11]. В условиях, если амилоидные пептиды гликированы, то их РКПП-опосредованное действие может усиливаться [12]. По этим причинам целесообразно рассматривать амилоидную трансформацию и гликирование белков как патогенетически связанные процессы.

Помимо рецептор-опосредованной связи, КПП способны напрямую влиять на амилоидную трансформацию белков. Модифицируя боковые цепи аминокислот и N-концевой остаток некоторых белков, КПП могут повлечь изменение поверхностного заряда белка, изменение его гидрофобных свойств и, как следствие, привести к амилоидной трансформации [13]. Предполагается, что гликирование способствует стабилизации протофибриллярных структур, а способность КПП к поперечному сшиванию белков позволяет формировать из амилоидных агрегатов более крупные конгломераты [13, 14]. В определенных условиях гликирование замедляет формирование зрелых амилоидных фибрилл, однако это связано с продлением срока существования цитотоксичных олигомерных форм [15, 16]. Олигомерные формы амилоида способны разрушать мембраны клеток, приводя к дисбалансу кальция, вызывать дисфункцию митохондрий, напрямую взаимодействовать с мембранными белками, приводя к изменению их нативного состояния [14]. Таким образом, как ускорение, так и замедление амилоидной трансформации на фоне гликирования имеет негативные последствия, что делает актуальной задачу изучения влияния гликирования на данный процесс.

Протекание реакций гликирования зависит от многих факторов, в частности, от присутствия ионов d-металлов в следовых концентрациях (включая переходные металлы и близкие к ним по свойствам), присутствия активных форм кислорода и др. [17, 18]. К переходным металлам относятся химические элементы, чьи атомы имеют частично заполненный d-подуровень или способные образовывать катионы с неполностью заполненным d-подуровнем (IUPAC¹). К металлам, близким по свойствам к переходным (некоторые из них иногда именуется пост-переходными) относится подгруппа цинка и сам цинк. Многие свойства цинка идентичны таковым переходных металлов, однако d-орбитали его заполнены². В значительной степени

биологическая роль переходных металлов обуславливается наличием незавершенного d-подуровня и того, как этот подуровень заполнен электронами, так как это, свою очередь, определяет склонность конкретного переходного металла к образованию тех или иных химических связей и их устойчивость. Кроме того, электронная конфигурация d-подуровня обуславливает наличие специфических устойчивых степеней окисления, и, как следствие, окислительно-восстановительные свойства самого металла и его ионов [19]. Было установлено, что способность к изменению степени окисления является важным свойством, благодаря которому некоторые переходные металлы способны стимулировать протекание гликирования [20, 21]. Так, в реакциях гликирования медь (II) восстанавливается до меди (I), а кислород преобразуется в супероксид-анион при участии перекиси водорода, источником которой служат некоторые этапы гликирования. После этого ионы меди (I) окисляются до меди (II), катализируя разложение перекиси водорода до гидроксил-радикала [20]. Следует отметить, что d-металлы (цинк, железо, медь и др.) вовлечены в патогенез конформационных болезней мозга и по независимым от гликирования механизмам, связанным как с прямым действием иона на белок (поперечное сшивание остатков тирозина и др.), так и опосредованно, через влияние на активность ферментов (секретазы и др.) [22–25, 10]. Таким образом, патогенетически связанными оказываются реакция гликирования, амилоидная трансформация белков, и активность ионов d-металлов, способных влиять на оба указанных процесса.

Амилоидная трансформация белка может быть смоделирована с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) [26, 27]. БСА склонен к усиленному образованию β-листов и протеканию амилоидной трансформации при физико-химическом воздействии (например, при нагревании), что обуславливает его частое использование в качестве модельного белка при изучении процессов амилоидной трансформации [28]. При температуре, пограничной для инициации амилоидной агрегации БСА, появляется возможность оценить способность изучаемого фактора ускорить или замедлить течение агрегации и амилоидной трансформации.

Интерес представляет сравнительное исследование способности ионов d-металлов влиять на интенсивность образования КПП в реакции гликирования, а также их способность стимулировать или подавлять образование амилоидных и неамилоидных агрегатов белка на фоне реакции гликирования и независимо от нее.

ЦЕЛЬ. Оценить сочетанное и независимое влияние фактора протекания реакции гликирования БСА и фактора присутствия в реакционной среде катионов d-металлов, а именно никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III), меди (II) или цинка (II), на процесс трансформации БСА в агрегаты амилоидной и неамилоидной природы. Оценить влияние указан-

¹ IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the «Gold Book»). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. DOI: 10.1351/goldbook.

² General Properties of Transition Metals. (2020, December 7). Retrieved: June 28, 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://chem.libretexts.org/@go/page/24341>.

ных факторов на интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин. Оценить способность указанных катионов d-металлов влиять на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование реакции гликирования

Субстрат гликирования – БСА (фракция V, 1 мг/мл, Химмед, Россия); гликирующий агент – глюкоза (0,36 М, Вектон, Россия); среда протекания реакции – деионизированная вода (pH 6,2, деионизатор Milli-Q, Германия) с добавлением одного из катионов переходных металлов, а именно никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III), меди (II) или цинка (II) в конечной концентрации 40 мкМ в виде солей $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ или $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ соответственно (или без них). Изучаемая концентрация солей металлов выбрана на основе ранее настроенной модели гликоксидации БСА глюкозой в присутствии $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, с модификациями [29, 30]. Интерес к сравнительному исследованию активностей d-металлов определяет необходимость их изучения в равных концентрациях. В организме концентрации изучаемых металлов переменны. Так, физиологические концентрации меди и цинка в сыворотке здоровых людей составляют ~1 мг/л (~15,7 мкМ и ~15,3 мкМ соответственно) [31, 32]. В то же время сообщается о значительно более высокой концентрации меди в амилоидных бляшках при болезни Альцгеймера (~400 мкМ) [10, 25]. При нейрональной активности цинк высвобождается в синаптическую щель и может достигать концентрации 300 мкМ [25]. По указанным причинам отобранная концентрация (40 мкМ) является компромиссной по отношению к широкому разбросу концентраций d-металлов в организме в норме и патологии, и в большей степени связана с установленной ранее активностью катиона меди (II).

Условия протекания реакции: температура 60°C, длительность инкубации: 24 часа. Указанные условия отобраны на основе данных литературы [33], свидетельствующих о том, что воздействие указанной температуры на БСА (автор использует трис-буфер с содержанием NaCl) благоприятно для трансформации α -спиралей белка в β -листы (чего может не происходить при более низких температурах), при этом с повышением температуры процесс трансформации интенсифицируется. В другом исследовании показано, что агрегации БСА при воздействии данной температуры не происходит (для БСА в Na-фосфатном буферном растворе) [34].

Определение конечных продуктов гликирования и интенсивности флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин

После инкубации аликвоты образцов (200 мкл) вносили в 96-луночный плоскодонный черный планшет, определяли интенсивность флуоресценции проб

при длинах волн возбуждения/испускания, специфичных для следующих КПГ: пентозидин (335/385 нм), весперлизин С (345/405 нм), весперлизины А и В (366/442 нм), кросслайн (379/463 нм) [35], а также измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения, превышающих 400 нм (440/520 нм) [36]. Имеются сведения о том, что флуоресцирующий при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм продукт (или продукты), относится к КПГ и способен образовывать поперечные сшивки белков [37]. Помимо КПГ определяли интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, при длинах волн возбуждения/испускания 295/335 нм, более специфичных для триптофана, и 270/330 нм, характерных для обеих аминокислот (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия) [38-40]. Оценка влияния гликирования и действия ионов d-металлов на флуоресценцию данных аминокислот информативна ввиду чувствительности показателя интенсивности их флуоресценции к изменению конформации белка и гликированию их аминокислотного окружения [41, 42]. Кроме этого, катионы меди (II) способствуют формированию дитиразиновых сшивок, что имеет значение для патогенеза болезни Альцгеймера [43], и в результате чего флуоресцентные характеристики тирозина изменяются. Нельзя исключить и возможности изменения флуоресценции при окислении триптофана и/или тирозина, а также активации тирозина и его прямого взаимодействия с продуктами реакции при гликировании его окружения [44, 42]. Это делает определение флуоресценции данных аминокислот актуальным для настоящего исследования, и позволяет косвенно отмечать изменения в протекании как гликирования, так и агрегации белка.

Исследование агрегации и амилоидной трансформации белков

В исследовании с применением спектрофотометрии дана оценка интенсивности образования белковых агрегатов и проведено спектрофлуориметрическое определение их амилоидной принадлежности в реакции с тιοфлавином Т (ThT). Спектрофотометрическое детектирование агрегатов БСА проведено по приросту оптической плотности при длине волны 405 нм [45] в аликвотах 200 мкл в 96-луночном плоскодонном прозрачном планшете (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия). В исследовании [45] показано, что оптическая плотность при данной длине волны прямо пропорциональна степени агрегации. Подтверждение амилоидной принадлежности агрегатов проведено в реакции с ThT (Sigma Aldrich, США), в конечной концентрации ThT 20 мкМ [46], путем определения интенсивности флуоресценции проб при длинах волн возбуждения/испускания 450/482 нм (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия).

Статистический анализ данных

С целью определения вклада каждого фактора (как фактора протекания реакции гликирования, так и фактора присутствия иона металла) статистическая обработка данных проведена с применением двухфакторного вариационного анализа с последующим множественным сравнением групп данных «все со всеми» по Тьюки, при уровне значимости $p \leq 0,05$ (GraphPad Prism 9). Корреляционный анализ проведен с применением метода ранговой корреляции по Спирмену (GraphPad Prism 9). Результаты представлены как среднее значение с учетом стандартной ошибки ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ**Анализ интенсивности флуоресценции триптофана и тирозина**

В результате анализа влияния исследуемых факторов на интенсивность флуоресценции триптофана и тирозина установлено, что более значимый вклад в изменение параметра вносят катионы металлов. Для катионов меди (II), железа (II), железа (III) и цинка (II) отмечена способность оказывать действие независимо от присутствия глюкозы (снижение интенсивности флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин отмечено не только в гликированных, но и в безглюкозных пробах) (табл.1). В то же время, не выявлено различий при сравнении интенсивности флуоресценции триптофана и тирозина в гликированных пробах, не содержащих металлов, с интен-

сивностью флуоресценции соответствующих негликированных проб (в которых присутствует только БСА). Несмотря на отсутствие собственного влияния реакции гликирования на интенсивность флуоресценции аминокислот, для некоторых металлов установлено, что они усиливают имеющуюся у них способность подавлять флуоресценцию аминокислот в присутствии глюкозы, что говорит о значимости фактора гликирования. Так статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции триптофана и тирозина в глюкоза-содержащих пробах (в сравнении с соответствующими пробами без глюкозы) отмечено для случаев протекания гликирования в присутствии катионов меди (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 270/330 нм и 295/335 нм), железа (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 270/330 нм) и цинка (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 270/330 нм). Таким образом, указанные катионы оказались способными к усилению своего действия в присутствии глюкозы. В отношении кобальта (II) эффект снижения флуоресценции тирозина и триптофана в присутствии глюкозы при сравнении с пробами без глюкозы не прослеживался. В присутствии никеля (II) данный эффект был слабым (наблюдались различия интенсивности флуоресценции гликированных проб, содержащих никель (II), с гликированными пробами без металлов, но отсутствовали статистически значимые различия сигналов от гликированных и безглюкозных проб, содержащих никель (II)).

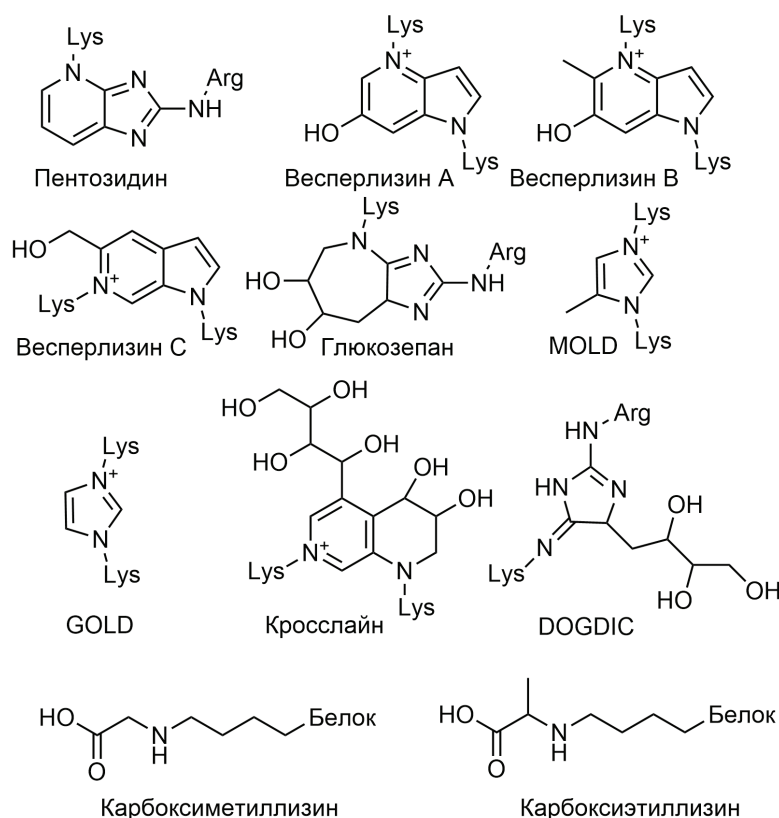


Рисунок 1 – Структуры различных конечных продуктов гликирования

Таблица 1 – Влияние исследуемых факторов на интенсивность флуоресцентной эмиссии, характерной для различных КПП, а также аминокислот триптофан и тирозин, абсолютные значения флуоресценции (M ± SEM)

Фактор глюкозы	Параметры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}}$), нм и соответствующий продукт	Фактор катиона металла							
		Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)	
Глюкоза	270/330	83147,2±1561,7	75475,8±1415,6	78131,2±1441,9	68838,8±1290,9	30211,8±1680,2	63999,6±1399,6	70210,8±1417,6	
	Без глюкозы	83063,0±1000,5	80763,0±664,4	78733,8±926,2	76121,0±279,1	56691,4±1055,4	62589,2±1609,8	76616,8±837,1	
Глюкоза	295/335	41994,3±1290,6	37012,8±1205,5	39814,8±1459,9	34861,6±1056,5	14637,2±587,9	31014,8±845,1	33909,6±707,4	
	Без глюкозы	43126,5±303,6	40918,8±757,4	38680,0±881,2	36587,8±813,1	27971,5±785,8	30535,0±1180,7	37617,0±456,1	
Глюкоза	335/385	752,8±13,4	538,6±15,8	580,6±17,2	490,2±15,0	757,0±29,5	395,0±11,9	748,8±17,7	
	Без глюкозы	284,5±6,9	278,0±4,0	268,5±3,1	244,3±4,2	250,5±6,5	202,8±6,3	302,5±12,7	
Глюкоза	345/405	812,4±14,6	578,8±15,3	609,4±14,5	594,0±10,2	1058,2±19,1	452,4±7,3	861,8±8,6	
	Без глюкозы	313,0±14,1	291,3±6,8	313,0±12,1	273,3±4,5	302,3±11,1	229,0±11,1	391,3±30,2	
Глюкоза	366/442	921,0±22,8	744,0±17,0	728,2±13,6	874,0±61,5	2009,8±37,0	666,0±13,2	977,0±5,6	
	Без глюкозы	491,0±11,0	477,2±9,2	561,2±33,9	504,8±49,4	594,8±21,5	390,0±27,6	661,4±40,8	
Глюкоза	379/463	826,6±21,7	675,4±18,7	644,2±10,9	786,6±47,2	1917,8±34,9	618,8±12,1	828,6±7,6	
	Без глюкозы	477,8±11,2	471,6±9,8	500,0±23,9	439,3±5,9	594,4±22,9	365,2±20,7	603,6±32,9	
Глюкоза	440/520	451,6±8,1	355,4±9,2	348,8±9,3	416,2±9,9	727,4±9,3	372,4±8,2	496,0±8,0	
	Без глюкозы	323,4±4,9	282,6±6,3	300,0±4,7	291,2±6,3	310,0±4,9	233,8±6,7	375,0±15,0	

Примечание: уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует p<0,0001; *** соответствует p<0,001; ** соответствует p<0,01; * соответствует p<0,05). Уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (#### соответствует p<0,0001; ### соответствует p<0,001; ## соответствует p<0,01; # соответствует p<0,05 (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки)

Таблица 2 – Влияние исследуемых факторов на образование агрегатов БСА, оптическая плотность проб при длине волны 405 нм, абсолютные значения ($M \pm SEM$)

Фактор глюкозы	Фактор катиона металла						
	Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)
Глюкоза	0,06±0,0004	0,06±0,0006	0,06±0,0020	0,19±0,0021 *****	1,08±0,0122 *****	0,37±0,0188 ****	0,65±0,0236 *****
Без глюкозы	0,05±0,0004	0,06±0,0007	0,05±0,0007	0,06±0,0007	0,18±0,0036 ****	0,4±0,0090 ****	1,02±0,0180 ****

Примечание: уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует $p < 0,0001$; *** соответствует $p < 0,001$; ** соответствует $p < 0,01$; * соответствует $p < 0,05$). Уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы: ##### соответствует $p < 0,0001$; #### соответствует $p < 0,001$; ### соответствует $p < 0,01$; # соответствует $p < 0,05$ (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки)

Таблица 3 – Влияние исследуемых факторов на амилоидную трансформацию БСА, интенсивность флуоресцентной эмиссии ThT при длинах волн возбуждения/испускания 450/482 нм, абсолютные значения ($M \pm SEM$)

Фактор глюкозы	Фактор катиона металла						
	Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)
Глюкоза	6051,0±320,2 ####	7954,2±391,5 *####	5740,8±283,3 ####	6083,4±241,7 ####	18277,3±792,1 ****#	2704,8±190,4 *****	13415,2±238,7 *****
Без глюкозы	11693,8±280,2	13841,6±109,3 **	9695,4±132,0 **	10887,6±157,8	16304,8±335,2 ****	7266,0±257,3 ****	17900,0±672,5 ****

Примечание: уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует $p < 0,0001$; *** соответствует $p < 0,001$; ** соответствует $p < 0,01$; * соответствует $p < 0,05$). Уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (##### соответствует $p < 0,0001$; #### соответствует $p < 0,001$; ### соответствует $p < 0,01$; # соответствует $p < 0,05$ (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки).

Влияние d-металлов на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования

Интенсивность флуоресценции при длинах волн, характерных для различных КПГ, отражает интенсивность протекания реакции гликирования. Как и ожидалось, во всех случаях в глюкоза-содержащих пробах установлен прирост интенсивности флуоресценции КПГ в сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (табл.1). Однако обращают на себя внимание различия в характере и степени влияния катионов d-металлов на реакцию гликирования. При сравнении интенсивностей флуоресценции КПГ металлсодержащих проб, в которых протекало гликирование, с показателями соответствующих проб без металлов установлено, что только катионы меди (II) (при всех длинах волн возбуждения/испускания, кроме 335/385 нм) и цинка (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм) обладали способностью усиливать образование КПГ. Остальные металлы, напротив, или со статистической значимостью препятствовали нарастанию флуоресценции при длинах волн, характерных для КПГ, или не изменяли значений показателя. При длинах волн, характерных для пентозидина (335/385 нм), ни один металл не оказался способным интенсифицировать образование КПГ в сравнении с пробами без металлов. В то же время никель (II), кобальт (II), железо (II) и железо (III) оказались способными снижать интенсивность сигнала, определяемого на данных длинах волн. Установленная активность позволяет выделить медь (II) и цинк (II) в разряд d-металлов, способных ускорять

протекание гликирования в описываемых условиях. Суммарные результаты представлены в таблице 1.

В отсутствие глюкозы незначительный прирост флуоресценции наблюдался при действии на альбумин катионов меди (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 379/463 нм) и цинка (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 345/405 нм, 366/442 нм, 379/463 нм и 440/520 нм). Частично подобный эффект, как и способность железа (III) снижать интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания, характерных для КПГ, может быть связан с действием на остаточные количества глюкозы, присутствие которой, вероятно, объяснимо технологией получения альбумина. В то же время, было показано, что в идентичной тест-системе присутствие катионов цинка также ведет к появлению флуоресценции при длинах волн 320/438 нм, обусловленной координированием (или комплексованием) катионов цинка аминокислотными остатками в различных сайтах альбумина [47], что в нашем случае позволяет предположить формирование координационных структур, аналогичных ранее описанным в работе Wu F.-Y. и соавторов [47]. В случае меди возможность ее взаимодействия с остатком лизина с образованием продукта, флуоресцирующего при длинах волн 370/440 нм, рассмотрена в работе Zhang M. и соавторов [48]. Приведенные сведения не исключают возможности образования иных продуктов, связанных со специфическим воздействием иона металла на белок и значимых для рассматриваемых в статье патогенозов.

Влияние d-металлов на агрегацию и амилоидную трансформацию БСА

Из данных литературы известно, что катионы переходных металлов (медь (II), железо (III)) способны стимулировать амилоидную трансформацию белков [10, 49]. Интерес представляет изучение влияния реакции гликирования на данное свойство металлов. Исследование оптической плотности реакционной среды при длине волны 405 нм используется для оценки кинетики образования белковых агрегатов при моделировании амилоидной трансформации [45]. Полученный в ходе настоящего исследования результат подтверждает способность некоторых из исследованных d-металлов (в ходе реакции гликирования и/или независимо) стимулировать агрегацию БСА. Результаты представлены в таблице 2.

Рассматривая собственную (независимую от гликирования) способность исследуемых d-металлов вызывать агрегацию БСА, следует отметить, что активность металлов можно расположить по возрастанию: никель (II) (не активен) = кобальт (II) (не активен) = железо (II) (не активен) < медь (II) < железо (III) < цинк (II) (табл. 2).

Протекание гликирования в среде без металлов не приводило к статистически значимой агрегации БСА. При этом гликирование влияло на способность некоторых катионов вызывать агрегацию БСА. Катионы никеля (II) и кобальта (II) не вызывали агрегации БСА ни самостоятельно, ни в присутствии глюкозы. Способность усиливать агрегацию БСА только в присутствии глюкозы, но не без нее, установлена для катионов железа (II). Для меди (II), железа (III) и цинка (II) агрегация БСА наблюдалась как в отсутствии глюкозы (вследствие собственной активности), так и при действии катионов на фоне реакции гликирования. В случае меди (II) интенсивность агрегации была выше в пробах с глюкозой, для железа (III) – результат одинаков для глюкоза-содержащих и безглюкозных проб, а в случае цинка (II) интенсивность агрегации была выше в пробах, не содержащих глюкозы.

Для исследованных катионов металлов наблюдается рассогласование между способностью влиять на образование КПГ в реакции гликирования и способностью стимулировать агрегацию БСА. Так, в присутствии глюкозы железо (II) и железо (III), вызывая агрегацию (табл. 2), не стимулируют образование КПГ (табл.1). Способность этих катионов к агрегации БСА не зависит от образования КПГ, а в случае железа (II) – не зависит от образования КПГ, но очевидно связана с присутствием глюкозы. В то же время при проведении корреляционного анализа по Спирмену установлена статистически значимая обратная корреляция между способностью ионов металлов агрегировать БСА в гликированных пробах и интенсивностью флуоресценции аминокислот тирозин и триптофан, при длинах волн 270/330 нм, специфичных для обеих аминокислот ($r = -0,85$, $p = 0,03$), и 295/335 нм, более специфичных для триптофана ($r = -0,93$, $p = 0,01$).

Параллельно изучению агрегации БСА, пробы были исследованы на предмет амилоидной принадлежности агрегатов в реакции с тиофлавином Т (ThT) – амилоид-специфичным агентом. Обращает на себя внимание более выраженная амилоидная трансформация БСА в безглюкозных пробах по сравнению с глюкоза-содержащими во всех случаях, кроме протекания реакции в присутствии меди (II). Медь (II) стимулирует амилоидную трансформацию БСА в присутствии глюкозы интенсивнее, чем без нее (табл. 3). В отношении остальных металлов и реакционной среды без таковых равномерно повышенная интенсивность флуоресценции ThT в безглюкозных пробах в сравнении с соответствующими им глюкоза-содержащими пробами указывает на то, что в описанных экспериментальных условиях гликирование препятствует амилоидной трансформации БСА. В то же время статистически значимая более высокая интенсивность флуоресценции ThT в пробах, гликированных в присутствии катионов меди (II), указывает на взаимное усиливающее действие факторов глюкозы и меди на интенсивность амилоидной трансформации (табл. 3). Из результата следует, что медь проявила как независимую от гликирования способность стимулировать амилоидную трансформацию БСА, так и нивелировала способность протекающей реакции гликирования замедлять таковую.

При оценке влияния фактора присутствия катионов каждого элемента на амилоидную трансформацию БСА установлено, что как в глюкозных, так и в безглюкозных пробах усиливают данный процесс катионы меди (II) и цинка (II) (в наибольшей степени), а также никеля (II) (в наименьшей степени). Катионы кобальта (II) незначительно подавляют реакцию (статистически значимо только в отсутствии глюкозы), а катионы железа (II) оказались неактивными. Для железа (III) установлена способность снижать флуоресценцию ThT как в глюкоза-содержащих, так и в безглюкозных пробах. Способность меди и цинка трансформировать белки в амилоидную форму ранее была неоднократно описана. Полученные нами неожиданные результаты в отношении слабой активности никеля согласуются с недавно установленной ролью никеля в образовании человеческого β -амилоида [24].

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что при отсутствии металлов реакция гликирования не влияет на интенсивность флуоресценции тирозина и триптофана (интенсивность флуоресценции гликированных и негликированных проб одинакова). Однако гликирование может усиливать способность металлов подавлять флуоресценцию данных аминокислот. В случае тирозина, возможный механизм снижения его флуоресценции описан для реакции коллагена с рибозо-5-фосфатом [41], и может быть связан с такими событиями, как гликирование аминокислот, расположенных в пространственной близости от тирозина (что

приводит к гашению его флуоресценции), изменение пространственной организации белка (что приводит к гашению флуоресценции тирозина), вступление в реакцию самого тирозина (не ожидается, что тирозин будет напрямую взаимодействовать с гликирующим агентом, но участие в реакции близлежащих остатков лизина или аргинина может привести к активации тирозина и последующему его гликированию или окислению). В то же время, для триптофана показано, что при протекании гликирования его остаток может окисляться [44], и этот процесс может усиливаться в присутствии меди (II) [42]. Так, снижение интенсивности флуоресценции триптофана в ходе реакции гликирования в присутствии меди (II) обусловлено как окислением остатка аминокислоты, так и изменением конформации белка [42]. Резюмируя сказанное, можно полагать, что d-металлы, способные более интенсивно подавлять флуоресценцию тирозина и/или триптофана в ходе гликирования, проявляют активность, влияя на указанные механизмы.

Известно, что способность некоторых d-металлов ускорять образование КПГ в реакции гликирования связана со стимулированием ими окислительных реакций. Это свойство характерно для таких металлов, как медь, а реакция, протекающая при их участии, именуется реакцией гликоксидации [20]. Так, роль меди (II) в протекании гликоксидации, предположительно, заключается в катализе переноса электронов от ендолов, образуемых из восстановленных моносахаридов или при фрагментации оснований Шиффа и продуктов Амадори, что приводит к образованию активных форм кислорода и дикарбонильных соединений. В этих реакциях медь (II), вероятно, восстанавливается до меди (I), а кислород преобразуется в супероксид-анион при участии перекиси водорода, источником которой служат некоторые этапы гликирования. Затем ионы меди (I) окисляются до меди (II), катализируя разложение перекиси водорода до гидроксил-радикала. С учетом этого можно заключить, что интенсификация реакции гликирования в присутствии некоторых исследованных нами переходных металлов может происходить по описанному механизму гликоксидации.

Особый интерес представляет анализ активности цинка как металла, не относящегося к переходным, но являющегося d-металлом. Согласно представлению о механизме гликоксидации при участии меди (II), для протекания реакции необходимо, чтобы ион металла был способен к изменению степени окисления. Ион цинка имеет постоянную степень окисления, однако он оказался способен слабо повышать интенсивность флуоресценции при некоторых длинах волн возбуждения/испускания, характерных для КПГ. Согласно данным литературы [50], цинк может проявлять антигликирующие, антиоксидантные и антиапоптотические свойства, а его дефицит может способствовать ускоренному образованию КПГ. Однако согласно исследованиям Zhuang X. и соавторов [51], в реакции гликирования, протекающей *in vitro*, цинк (II) способен усиливать образование флуорес-

цирующих КПГ, что согласуется с полученными нами результатами. По данным того же исследования [51] переходный металл марганец проявляет способность подавлять образование КПГ подобно тому, как это описано для никеля, кобальта и железа, также, относящихся к переходным металлам. Все это указывает на то, что принадлежность металла к переходным и способность его иона к изменению степени окисления, вероятно, не является необходимым и достаточным условием для ускорения реакции гликирования. Также это указывает на уникальность свойств цинка в ряду изученных металлов.

Обобщая результаты исследования о влиянии d-металлов на флуоресценцию аминокислот тирозин и триптофан и о влиянии d-металлов на реакцию гликирования, можно сделать предположение о том, что механизмы влияния металлов на оба процесса различаются (по меньшей мере, имеются компоненты активности, связанные с влиянием только на один процесс). Результаты позволяют сделать предположение о дополнительном, обусловленном фактором гликирования (не ограниченном собственным действием иона металла) механизме повреждения тирозина и/или триптофана, проявляющемся в ходе протекания реакции в присутствии катионов меди (II), железа (II), цинка (II) и, возможно, никеля (II). При этом повышение интенсивности флуоресценции при длинах волн, характерных для КПГ, расцениваемое как интенсификация реакции гликирования, отмечено только при протекании гликирования в присутствии катионов меди (II) (в большей степени) и цинка (II) (в меньшей степени).

Обсуждая результаты изучения агрегации альбумина, следует отметить, что согласно данным литературы [43], одним из факторов патогенетического действия катионов меди (II) при болезни Альцгеймера является ее участие в формировании димеров амилоидов, связанных дитирозиновыми шивками. Это согласуется с наблюдаемым в настоящем исследовании интенсивным подавлением флуоресценции аминокислот в присутствии меди, а также с наличием статистически значимой обратной корреляции интенсивности флуоресценции этих аминокислот и степени агрегации БСА для исследованных катионов. Таким образом, снижение интенсивности флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин в присутствии ионов d-металлов, очевидно, сопровождает процесс агрегации БСА. С наибольшей интенсивностью агрегация БСА протекала в присутствии ионов, показавших способность усиливать образование КПГ (медь, цинк).

Как сказано выше, амилоидная трансформация белка при гликировании зависит от многих факторов, и, в частности, от типа белка. Так, согласно данным литературы, усиление амилоидной трансформации наблюдается при гликировании альбумина (бычьего и человеческого), A β -белка, β 2 микроглобулина и др. В противоположность этому способность α -синуклеина к образованию амилоидных фибрилл после воздействия на него гликирующим агентом метилг-

лиоксалем была сниженной, и полученные агрегаты имели характер расплавленной глобулы [52]. Согласно полученным нами результатам, гликирование в описанных экспериментальных условиях препятствует образованию ThT-чувствительных форм амилоида. Подобный результат наблюдается при протекании гликирования в присутствии никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III) и цинка (II), но не меди (II), проявившей способность усиливать амилоидную трансформацию и агрегацию БСА. Banerjee S. описывает снижение интенсивности амилоидной трансформации лизоцима куриного белка после воздействия на белок метилглиоксалем. Основываясь на данном результате, автор выдвигает спорное предположение о том, что карбонильные соединения могут быть использованы в фармакологических целях [53]. Несмотря на сомнительность терапевтического использования карбонильных соединений, данное исследование и подобные ему подтверждают тот факт, что гликирование способно не только потенцировать амилоидную трансформацию [13], но и препятствовать ей [13, 53]. В то же время известно, что замедление амилоидной трансформации под действием гликирования может быть связано продлением времени пребывания амилоида в олигомерной форме – форме, имеющей наивысшую цитотоксичность. Последнее нивелирует потенциальную полезность замедления амилоидной трансформации под действием гликирования. Согласно данным литературы [54, 55], ThT может не выявлять образования олигомерных форм амилоида, в отличие от иных форм (мономер, фибриллы). Можно выдвинуть предположение о том, что сравнительно меньшая интенсивность флуоресценции ThT в пробах, гликированных в присутствии всех ионов d-металлов за исключением меди (II), соотносится с возможностью замедления реакции на стадии образования олигомеров, что, однако, будет являться предметом дальнейших исследований. Для гликирования в присутствии меди (II) подобное свойство установлено не было.

Очевидно, что при оценке полученных результатов следует учитывать все условия протекания эксперимента (не только факторы гликирования и присутствия металла, но и нагревание, состав и рН

реакционной среды и др.). Можно полагать, что неучтенные факторы также могут влиять на способность альбумина претерпевать амилоидную трансформацию при гликировании, и в иных условиях протекание реакции может приводить к иному результату. Таким образом, для всесторонней оценки способности гликирования влиять на амилоидную трансформацию следует учитывать способность белка трансформироваться в амилоидную форму в различных экспериментальных условиях (различные значения рН, температуры, ионной силы буферного раствора и др.), включая проведение исследований в условиях, близких к физиологическим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследований было показано, что протекание реакции гликирования влияет на амилоидную трансформацию БСА, а в присутствии ионов d-металлов оказывает влияние на способность некоторых из них вызывать агрегацию и амилоидную трансформацию. Катионы меди (II) в описанных экспериментальных условиях оказались единственными способными усиливать образование КППГ, глюкоза-опосредованно и глюкоза-независимо снижать интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, вызывать агрегацию и амилоидную трансформацию БСА. Ионы прочих металлов проявляли данные эффекты лишь частично, в различных сочетаниях. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что в ряду ионов d-металлов, таких как никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) и цинк (II), только ионы меди (II), вероятно, выступают наиболее значимым фактором усиления амилоидной трансформации и агрегации БСА, и являются наиболее активным катализатором образования КППГ в реакции гликирования. Таким образом, мы полагаем, что данный элемент является перспективной мишенью для разработки методов фармакологического контроля патологических состояний, связанных со всеми рассмотренными процессами – гликированием, агрегацией и амилоидной трансформацией белков (поздние осложнения сахарного диабета, включая диабетическую энцефалопатию, конформационные болезни мозга и др.).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-1887.2020.7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Р.А. Литвинов – разработка идеи исследования, планирование, подготовка и написание текста публикации, организация и контроль проведения исследования на всех его этапах; А.В. Гондарева – постановка и проведение реакции гликирования, подготовка реагентов, получение первичных данных; Л.Э. Усмьянова – постановка и проведение реакции гликирования, подготовка реагентов, получение первичных данных; Д.Р. Клименко – подготовка реагентов, статистическая обработка первичных данных, корректировка текста публикации на этапе ее подготовки, работа с источниками литературы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Perrone A., Giovino A., Benny J., Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – Art. No.3818196. DOI: 10.1155/2020/3818196.
- Chaudhuri J., Bains Y., Guha S., Kahn A., Hall D., Bose N., Gugliucci A., Kapahi P. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality // *Cell Metab.* – 2018. – Vol. 28, No.3. – P. 337–352. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.08.014.
- Yu L., Chen Y., Xu Y., He T., Wei Y., He R. D-ribose is elevated in T1DM patients and can be involved in the onset of encephalopathy // *Aging (Albany NY).* – 2019. – Vol. 11, No.14. – P. 4943–4969. DOI: 10.18632/aging.102089.
- Akhter F., Chen D., Akhter A., Sosunov A.A., Chen A., McKhann G.M., Yan S.F., Yan S.S.D. High Dietary Advanced Glycation End Products Impair Mitochondrial and Cognitive Function // *J Alzheimers Dis.* – 2020. – Vol. 76, No.1. – P. 165–178. DOI: 10.3233/JAD-191236.
- Vitek M., Bhattacharya K., Glendening J., Stopa E., Vlassara H., Bucala R., Manogue K., Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994. – Vol. 91, No.11. – P. 4766–4770. DOI: 10.1073/pnas.91.11.4766.
- König A., Vicente M.H., Outeiro T.F. Alpha-Synuclein Glycation and the Action of Anti-Diabetic Agents in Parkinson's Disease // *J Parkinsons Dis.* – 2018. – Vol. 8, No.1. – P. 33–43. DOI: 10.3233/JPD-171285.
- Gan W.J., Gao C.L., Zhang W.Q., Gu J.L., Zhao T.T., Guo H.L., Zhou H., Xu Y., Yu L.L., Li L.F., Gui D.K., Xu Y.H. Kuwanon G protects HT22 cells from advanced glycation end product-induced damage // *Exp Ther Med.* – 2021. – Vol. 21, No.5. – Art. No.425. DOI: 10.3892/etm.2021.9869.
- Kong Y., Wang F., Wang J., Liu C., Zhou Y., Xu Z., Zhang C., Sun B., Guan Y. Pathological Mechanisms Linking Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) // *Front. Aging Neurosci.* – 2020. – Vol. 12. – Art. No.217. DOI: 10.3389/fnagi.2020.00217.
- Yan S.S., Chen D., Yan S., Guo L., Du H., Chen J.X. RAGE is a key cellular target for Abeta-induced perturbation in Alzheimer's disease // *Front Biosci (Schol Ed).* – 2012. – Vol. 4. – P. 240–250. DOI: 10.2741/265.
- Kim D.K., Song J.W., Park J.D., Choi B.S. Copper induces the accumulation of amyloid-beta in the brain // *Mol. Cell. Toxicol.* – 2013. – Vol. 9. – P. 57–66. DOI: 10.1007/s13273-013-0009-0.
- Piras S., Furfaro A.L., Domenicotti C., Traverso N., Marinari U.M., Pronzato M.A., Nitti M. RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – Art. No.9348651. DOI: 10.1155/2016/9348651.
- Li X.-H., Du L.-L., Cheng X.-S., Jiang X., Zhang Y., Lv B.-L., Liu R., Wang J.-Z., Zhou X.-W. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4, No.6. – e673. DOI: 10.1038/cddis.2013.180.
- Iannuzzi C., Irace G., Sirangelo I. Role of glycation in amyloid: Effect on the aggregation process and cytotoxicity // *IntechOpen* – 2016. – 165 p. DOI: 10.5772/62995.
- Sirangelo I., Iannuzzi C. Understanding the Role of Protein Glycation in the Amyloid Aggregation Process // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, No.12. – Art. No. 6609. DOI: 10.3390/ijms22126609.
- Milordini G., Zacco E., Percival M., Puglisi R., Dal Piaz F., Temussi P., Pastore A. The Role of Glycation on the Aggregation Properties of IAPP // *Front Mol Biosci.* – 2020. – Vol. 7. – Art. No. 104. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00104.
- Emendato A., Milordini G., Zacco E., Sicorello A., Dal Piaz F., Guerrini R., Thorogate R., Picone D., Pastore A. Glycation affects fibril formation of A β peptides // *J Biol Chem.* – 2018. – Vol. 293, No.34. – P. 13100–13111. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002275.
- Bhuiyan M.N., Mitsuhashi S., Sigetomi K., Ubukata M. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation via chelating metal ions, trapping methylglyoxal, and trapping reactive oxygen species // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2017. – Vol. 81, No.5. – P. 882–890. DOI: 10.1080/09168451.2017.1282805.
- Wu Q., Li S.Y., Yang T., Xiao J., Chua Q.M., Li T., Xie B.J., Sun Z.D. Inhibitory effect of lotus seedpod oligomeric procyanidins on advanced glycation end product formation in a lactose-lysine model system // *Electronic Journal of Biotechnology.* – 2015. – Vol. 18, No.2. – P. 68–76. DOI: 10.1016/j.ejbt.2014.10.005.
- Clayton P.T. Inherited disorders of transition metal metabolism: an update // *J Inher Metab Dis.* – 2017. – Vol. 40, No.4. – P. 519–529. DOI: 10.1007/s10545-017-0030-x.
- Serban A.I., Condac E., Costache M., Dinischiotu A. The relationship between ages, Cu²⁺ and crosslinking of collagen // *Revue Roumaine de Chimie.* – 2009. – Vol. 54, No.1. – P. 93–101.
- Bavkar L.N., Patil R.S., Rooge S.B., Nalawade M.L., Arvindekar A.U. Acceleration of protein glycation by oxidative stress and comparative role of antioxidant and protein glycation inhibitor // *Mol Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 459. – P. 61–71. DOI: 10.1007/s11010-019-03550-7.
- Sadakane Y., Kawahara M. Implications of Metal Binding and Asparagine Deamidation for Amyloid Formation // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, No.8. – Art. No. 2449. DOI:10.3390/ijms19082449.
- Xu Y., Xiao G., Liu L., Lang M. Zinc transporters in Alzheimer's disease // *Mol Brain.* – 2019. – Vol. 12. – Art. No. 106. DOI: 10.1186/s13041-019-0528-2.
- Benoit S.L., Maier R.J. The nickel-chelator dimethylglyoxime inhibits human amyloid beta peptide in vitro aggregation // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, No.1. – Art. No. 6622. DOI: 10.1038/s41598-021-86060-1.
- Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques // *J Neurol Sci.* – 1998. – Vol. 158. – P. 47–52. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00092-6.
- de la Arada I., Seiler C., Mäntele W. Amyloid fibril formation from human and bovine serum albumin followed by quasi-simultaneous Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and static light scattering (SLS) // *Eur Biophys J.* – 2012. – Vol. 41, No.11. – P. 931–938. DOI: 10.1007/s00249-012-0845-1.
- Holm N.K., Jespersen S.K., Thomassen L.V., Wolff T.Y., Sehgal P., Thomsen L.A., Christiansen G., Andersen C.B., Knudsen A.D., Otzen D.E. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – Vol. 1774, No.9. – P. 1128–1138. DOI: 10.1016/j.bbapap.2007.06.008.
- Ma X.J., Zhang Y.J., Zeng C.M. Inhibition of Amyloid Aggregation of Bovine Serum Albumin by Sodium Dodecyl Sulfate at Submicellar Concentrations // *Biochemistry (Moscow).* – 2018. – Vol. 83, No.1. – P. 60–68. DOI: 10.1134/S000629791801008X.
- Литвинов Р.А., Косолапов В.А., Муравьева Е.А., Скачко И.В., Шамшина Д.Д. Модифицированный метод изучения реакции гликоксидации // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2020. – Т. 2, № 74. – С. 61–66.
- Литвинов Р.А., Усмьянова Л.Э., Клименко Д.Р., Гонтарева А.В. Парадоксальная активность аминоксидина в модели гликоксидации в присутствии катионов Cu(II) // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2020. – № 3 (75). – С. 159–165.
- Ramirez Segovia A.S., Wrobel K., Acevedo Aguilar F.J., Corrales Escobosa A.R., Wrobel K. Effect of Cu(II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach // *Metalloomics.* – 2017. – 9(2). – P. 132–140. DOI: 10.1039/c6mt00235h.
- Michalska-Mosiej M., Socha K., Soroczyńska J., Karpińska E., Łazarczyk B., Borawska M.H. Selenium, Zinc, Copper, and Total Antioxidant Status in the Serum of Patients with Chronic Tonsillitis // *Biol Trace Elem Res.* – 2016. – Vol. 173, No.1. – P. 30–34. DOI:10.1007/s12011-016-0634-2.

33. Shanmugam G., Polavarapu P.L. Vibrational circular dichroism spectra of protein films: thermal denaturation of bovine serum albumin // *Biophys Chem.* – 2004. – Vol. 111, No.1. – P. 73–77. DOI: 10.1016/j.bpc.2004.04.005.
34. Chebotareva N.A., Roman S.G., Borzova V.A., Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Kurganov B.I. Chaperone-Like Activity of HSPB5: The Effects of Quaternary Structure Dynamics and Crowding. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, No.14. – Art. No.4940. DOI: 10.3390/ijms21144940.
35. Séro L., Sanguinet L., Blanchard P., Dang B.T., Morel S., Richomme P., Séraphin D., Derbré S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18, No.11. – P. 14320–14339. DOI: 10.3390/molecules181114320.
36. Beisswenger P.J., Howell S., Mackenzie T., Corstjens H., Muizzuddin N., Matsui M.S. Two fluorescent wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes // *Diabetes Technol Ther.* – 2012. – Vol. 14, No.3. – P. 285–292. DOI: 10.1089/dia.2011.0108.
37. Zhang Y., Baloglu F.K., Ziemer L.E.H., Liu Z., Lyu B., Arendt L.M., Georgakoudi I. Factors associated with obesity alter matrix remodeling in breast cancer tissues // *J Biomed Opt.* – 2020. – Vol. 25, No.1. – P. 1–14. DOI: 10.1117/1.JBO.25.1.014513.
38. Oto N., Oshita S., Makino Y., Kawagoe Y., Sugiyama J., Yoshimura M. Non-destructive evaluation of ATP content and plate count on pork meat surface by fluorescence spectroscopy // *Meat Sci.* – 2013. – Vol. 93, No.3. – P. 579–585. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.11.010.
39. Yang H., Xiao X., Zhao X., Wu Y. Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine // *Selected Papers of the Chinese Society for Optical Engineering Conferences held October and November 2016.* – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Vol. 10255. –102554M. DOI: 10.1117/12.2268397.
40. Lakowicz J.R. *Protein Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer, Boston, MA. (2006). DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4_16.
41. Bansode S., Bashtanova U., Li R., Clark J., Müller K.H., Puzkarska A., Goldberga I., Chetwood H.H., Reid D.G., Colwell L.J., Skepper J.N., Shanahan C.M., Schitter G., Mesquida P., Duer M.J. Glycation changes molecular organization and charge distribution in type I collagen fibrils // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 10. – Art. No. 3397. DOI: 10.1038/s41598-020-60250-9.
42. Hunt J.V., Wolff S.P. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications // *Free Radic Res Commun.* – 1991. – Vol. 12–13. – P. 115–123. DOI: 10.3109/10715769109145775.
43. Ejaz H.W., Wang W., Lang M. Copper Toxicity Links to Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Therapeutics Approaches // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, No.20. – Art. No. 7660. DOI: 10.3390/ijms21207660.
44. Chetyrkin S.V., Mathis M.E., Ham A.J., Hachey D.L., Hudson B.G., Voziyan P.A. Propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 44, No.7. – P. 1276–1285. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.016.
45. Wang S.S., Chen Y.T., Chou S.W. Inhibition of amyloid fibril formation of beta-amyloid peptides via the amphiphilic surfactants // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – Vol. 1741, No.3. – P. 307–313. DOI: 10.1016/j.bbdis.2005.05.004.
46. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils // *J Struct Biol.* – 2005. – Vol. 151, No.3. – P. 229–238. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.006.
47. Wu F.Y., Zhang L.N., Ji Z.J., Wan X.F. Spectroscopic investigation of the interaction between thiourea-zinc complex and serum albumin // *Journal of Luminescence.* – 2010. – Vol. 130. – P. 1280–1284.
48. Zhang M., Qiao J., Zhang S., Qi L. Copper nanoclusters as probes for turn-on fluorescence sensing of L-lysine // *Talanta.* – 2018. – Vol. 182. – P. 595–599. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.035.
49. Tahmasebinia F., Emadi S. Effect of metal chelators on the aggregation of beta-amyloid peptides in the presence of copper and iron // *Biometals.* – 2017. – Vol. 30, No.2. – P. 285–293. DOI: 10.1007/s10534-017-0005-2.
50. Kheirouri S., Alizadeh M., Maleki V. Zinc against advanced glycation end products // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2018. – Vol. 45, No.6. – P. 491–498. DOI: 10.1111/1440-1681.12904.
51. Zhuang X., Pang X., Zhang W., Wu W., Zhao J., Yang H., Qu W. Effects of zinc and manganese on advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-mediated endothelial cell dysfunction // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 90, No.3–4. – P. 131–139. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.10.025.
52. Iannuzzi C., Irace G., Sirangelo I. Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation // *Front Mol Biosci.* – 2014. – Vol. 1. – Art. No. 9. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00009.
53. Banerjee S. Effect of glyoxal and 1-methylisatin on stress-induced fibrillation of Hen Egg White Lysozyme: Insight into the anti-amyloidogenic property of the compounds with possible therapeutic implications // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. – Vol. 165. – P. 1552–1561. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.017.
54. Persichilli C., Hill S.E., Mast J., Muschol M. Does Thioflavin-T Detect Oligomers Formed During Amyloid Fibril Assembly // *Biophysical Journal.* – 2011. – Vol. 100, No.3. (Suppl 1). – Art. No. 538A. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.12.3140.
55. Hanczyc P., Fita P. Laser Emission of Thioflavin T Uncovers Protein Aggregation in Amyloid Nucleation Phase // *ACS Photonics.* – 2021. DOI: 10.1021/acsp Photonics.1c00082.

АВТОРЫ

Литвинов Роман Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболитных лекарственных средств отдела фармакологии и биоинформатики Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством Волгоградского государственного медицинского университета; научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр». ORCID ID: 0000-0002-0162-0653. E-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Гонтарева Арина Владимировна – студент 6-го курса, специальность «Медицинская биохимия», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, соиспол-

нитель гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых, кандидатов наук МК-1887.2020.7. E-mail: arinaarinag@gmail.com

Усмьянова Людмила Эдуардовна – студент 6-го курса, специальность «Медицинская биохимия», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, соисполнитель гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых, кандидатов наук МК-1887.2020.7. E-mail: mila.getmanets@gmail.com

Клименко Дарья Романовна – студентка 4-го курса, специальность «Фармация», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: vip.klimenko.darya@mail.ru