

УДК 544.144.22

**РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
МЕДЬСОДЕРЖАЩЕГО ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА Cu(II)GHK****М.А. Кременная, М.А. Солдатов, Ю.С. Подковырина, И.А. Дадашева, А.В. Солдатов**

*Международный исследовательский центр "Интеллектуальные материалы", Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*  
E-mail: kremennayamariya@gmail.com

*Статья поступила 2 декабря 2016 г.**С доработки — 10 января 2017 г.*

Комплекс Cu(II)GHK (Cu(II)—Gly—His—Lys — Глицил—Гистидил—Лизин) представляет интерес в качестве модельного пептида для отработки методики исследования структуры металлических центров в белках, в частности, центра связывания меди в  $\beta$ -амилоиде. Были измерены спектры рентгеновского поглощения для водного раствора Cu(II)GHK. Стабильность комплекса под воздействием рентгеновского излучения контролировали с помощью оптической спектроскопии. Были рассмотрены структурные модели с различной координацией медного центра, построенные на базе кристаллографической структуры. На основании анализа теоретических спектров рентгеновского поглощения построенных структур были выбраны две оптимальные модели. Для выбранных моделей была проведена оптимизация структурных параметров. Установлено, что лучшее согласие с экспериментом показывает спектр пятикоординированной модели с молекулами воды в экваториальной и нижней аксиальной позициях с расстоянием Cu—O 1,97 и 2,31 Å соответственно.

DOI: 10.15372/JSC20170620

**Ключевые слова:** комплекс Cu(II)GHK, XANES, локальная атомная структура, пептид, метод конечных разностей.

**ВВЕДЕНИЕ**

Медь является важнейшим микроэлементом присутствующим во всех живых организмах. Она входит в состав многих ферментов и белков, осуществляющих основные биологические функции, необходимые для роста и развития, участвует в процессах митохондриального дыхания, сшивки эластина, а также служит в качестве каталитического кофактора в ферментах [ 1 ]. Содержание меди в организме взрослого здорового человека составляет порядка 110 мг: 9 мг в головном мозге, 10 мг в печени, 46 мг в скелете и костном мозге, 26 мг в мышцах скелета и 6 мг в крови [ 2 ]. Однако присутствие меди сверх клеточных потребностей может приводить к ее цитотоксичности. Медь может участвовать в реакциях (типа Фентона), приводящих к образованию активных форм кислорода (АФК). АФК, в свою очередь, могут привести к перекисному окислению липидов в мембранах, окислению белков, а также возможному расщеплению молекул ДНК и РНК. Образование и действие АФК являются основными факторами, способствующими развитию различных патологий, таких как рак, старение, а также нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера или прионных болезней [ 3 ]. При болезни Альцгеймера медь образует комплекс с пептидом  $\beta$ -амилоида и модулирует его агрегацию [ 1 ].

Кроме того, комплекс меди с  $\beta$ -амилоидом при взаимодействии с такими природными восстановителями, как аскорбиновая кислота, может катализировать образование АФК [ 4 ].

Трипептид глицил—гистидил—лизин (Gly—His—Lys (GHK)) представляет собой природный пептид, извлеченный из плазмы крови, обладающий высоким сродством к меди [ 5 ]. Пептид GHK связывается с Cu(II) в стехиометрическом соотношении 1:1 с условной константой диссоциации  $2,6 \pm 0,4 \times 10^{-14}$  М при значении pH 7,4 и отсутствии конкурирующего хелатного соединения глицина и буферного раствора HEPES 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота [ 6 ]. Пептид GHK впервые был выделен из плазмы крови Л. Пиккартом и др. [ 5 ] и описан в качестве фактора роста клеток печени. Дальнейшие исследования показали, что комплекс Cu(II)GHK обладает широким спектром биологической активности, в том числе ускоряет заживление ран, улучшает регенерацию тканей и стимулирует выработку коллагена [ 7 ]. Исследуемый пептид обладает способностью влиять на окислительно-восстановительные свойства меди, блокировать образование активных форм кислорода и производить детоксикацию перекисного окисления липидов [ 8 ].

Методами рентгеноструктурного анализа было установлено, что при кристаллизации образца атомы меди координируются за счет трех мономеров GHK [ 9 ]. Каждый из атомов меди координируется тремя атомами азота в экваториальных позициях от одного мономера, одним атомом кислорода в экваториальной позиции от второго мономера и атомом кислорода в аксиальной позиции от третьего. Однако масс-спектроскопия водных растворов пептидного комплекса Cu(II)GHK свидетельствует о преобладании моноядерных комплексов. Таким образом, для медьсодержащего пептидного комплекса Cu(II)GHK остается открытым вопрос о координации атома меди в водном буферном растворе.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Приготовление пептида.** Использовались коммерческие реактивы без дополнительного очищения: трипептид GHK (Bachem, Швейцария), CuSO<sub>4</sub> и фосфатный буферный раствор (Акватест, Россия). Для приготовления растворов использовали деионизованную воду с удельным сопротивлением 18 МОм·см. Раствор пептида GHK приготовлен в 0,1 М фосфатном буферном растворе (pH 7,4) с концентрацией 20 ммоль/л.

**Характеризация.** Спектры рентгеновского поглощения для *K*-края Cu(II) для пептидного комплекса Cu(II)GHK в водном буферном растворе (pH 7,4) были получены на лабораторном спектрометре рентгеновского поглощения R-XAS Looper (Rigaku) в режиме измерения выхода флуоресценции с использованием твердотельного полупроводникового детектора. Рабочие значения напряжения и тока рентгеновской трубки составляли 20 кВ и 70 мА соответственно, сканирование по энергии проводили с помощью кристалла-монокроматора Ge(220). Проводилась серия измерений из пяти проходов, представленный спектр получен усреднением нескольких сканов. Раствор пептидного комплекса помещали в стеклянную жидкостную ячейку, измерения проводили при комнатной температуре. До и после измерений на рентгеновском спектрометре измеряли спектры на оптическом спектрометре Shimadzu UV-2600.

**Теоретический анализ** спектров рентгеновского поглощения проводили на основе метода конечных разностей в ускоренной версии программы FDMNES [ 10 ]. Для теоретических и экспериментальных спектров рентгеновского поглощения проводили процедуру интерполяции в области энергий 8970—9050 эВ с шагом 0,1 эВ. Для сравнения теоретических и экспериментальных спектров использовали стандартный критерий — среднеквадратичное отклонение.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведен экспериментальный спектр рентгеновского поглощения для *K*-края Cu(II) комплекса Cu(II)GHK. Экспериментальный спектр имеет три основных спектральных особенности: предкраевую особенность *A* на энергии 8978 эВ ( $1s$ — $3d$ -переход), плечо *B* на 8988 эВ (Cu  $1s$ — $4p$ ) и основной максимум *C* на 8997 эВ ( $1s$ — $4p$ ) [ 11 ]. На рис. 1 снизу приведена первая производная экспериментального спектра, которая наглядно демонстрирует наличие указанных спектральных особенностей.

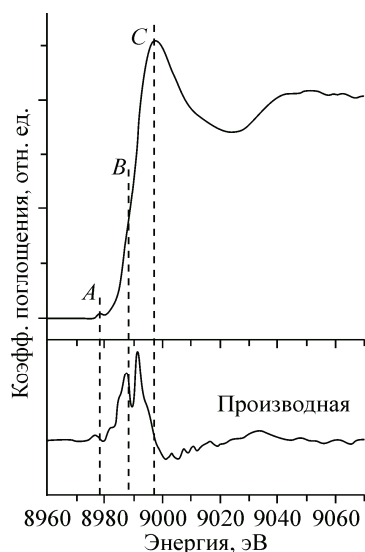


Рис. 1. Экспериментальный спектр рентгеновского поглощения для *K*-края меди(II) в пептидном комплексе Cu(II)GHK и первая производная XANES спектра

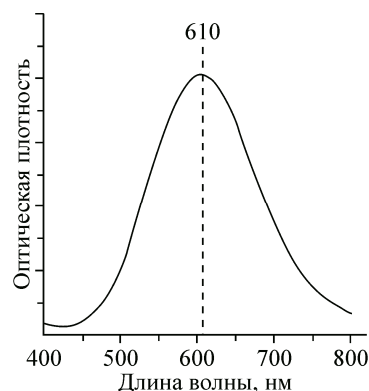


Рис. 2. Оптический спектр пептидного комплекса Cu(II)GHK после проведения измерений спектров рентгеновского поглощения

Для исследуемого комплекса возможны два варианта повреждения рентгеновским пучком: деградация пептида или фотовосстановление меди(II) → медь(I). При анализе спектров рентгеновского поглощения не наблюдается изменения формы спектров, что свидетельствует о сохранении координации меди в ходе измерений. В свою очередь, отсутствие дополнительных спектральных особенностей в области 8983—8985 эВ, характерных для Cu(I), свидетельствует о сохранении степени окисления атома меди.

Для комплекса Cu(II)GHK до и после измерения спектров рентгеновского поглощения были сняты оптические спектры с тем, чтобы проследить наличие изменений образца под воздействием рентгеновского излучения. Переходам меди *d—d* в Cu(II)GHK соответствует максимум оптического спектра на 610 нм [9]. На рис. 2 приведен оптический спектр для комплекса Cu(II)GHK после измерения спектров рентгеновского поглощения. Была проведена аппроксимация вкладов различных составляющих в оптический спектр функциями Гаусса. Установлено, что максимум рассматриваемого пика на экспериментальных спектрах, измеренных до и после облучения рентгеном, находится при 610 нм, что соответствует расщеплению кристаллического поля Cu(II)GHK. Из полученных данных следует, что отрыва лигандов от центрального атома не происходит и степень окисления атома меди не изменяется. Оптические спектры на рис. 2 также свидетельствуют о том, что пептид не подвергается радиационному повреждению.

Как уже было сказано выше, вопрос о структуре пептидного комплекса Cu(II)GHK в водном растворе остается открытым. Структура комплекса была получена методом рентгеновской дифракции на монокристалле [9]. При этом атомы меди координируются за счет трех мономеров GHK. Каждый из атомов меди связывается с тремя атомами азота: NH<sub>2</sub> глицина, N $\epsilon$  гистидина и амидной группой скелета, принадлежащими одному мономеру GHK. Четвертый экваториальный лиганд — атом кислорода карбоксилатной группы лизина соседнего мономера — находится на расстоянии 1,97 Å. Пятый аксиальный лиганд тоже является атомом кислорода карбоксилатной группы лизина, но уже третьего мономера GHK и расположен на расстоянии 2,51 Å. По данным масс-спектрологии получено, что в растворе наблюдается менее 5 % димеров Cu(II)<sub>2</sub>GHK<sub>2</sub> комплекса [9]. Эти данные свидетельствуют о том, что структура комплекса в водном растворе отличается от кристаллической, и медь могут координировать атомы только одного мономера GHK или молекулы воды. Таким образом, в растворе из ближайшего окружения медного центра комплекса уходят карбоксилатные группы, так как они принадлежат лизину соседних мономеров, и их место могут занимать молекулы растворителя.

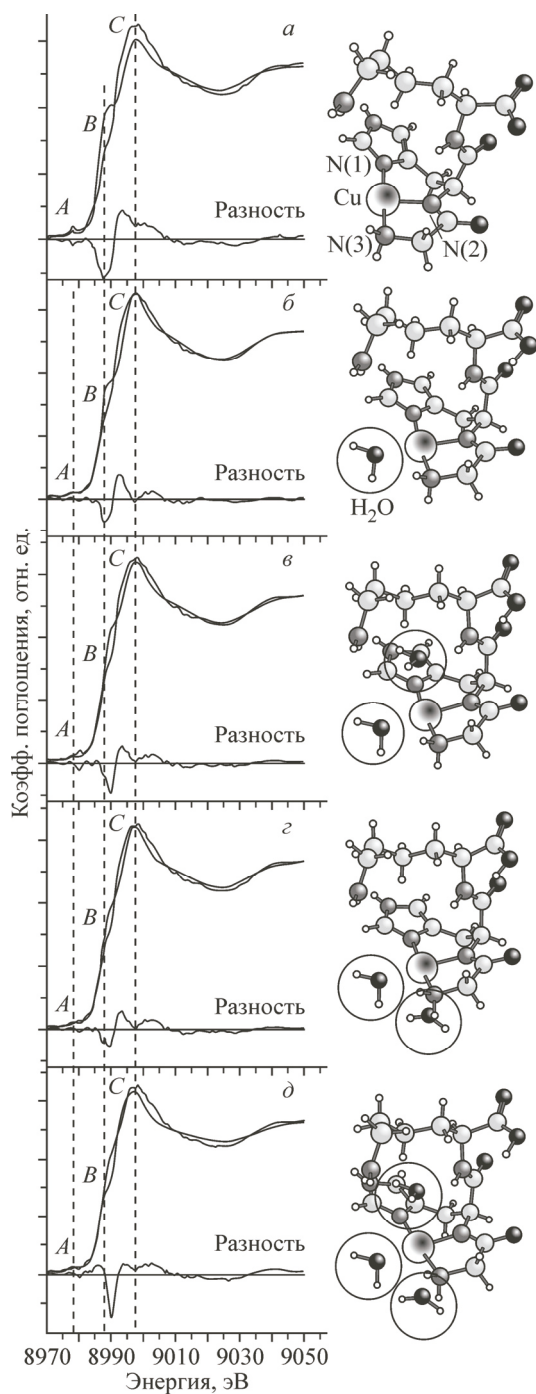


Рис. 3. Сравнение теоретических Cu(II)K-XANES спектров для комплекса Cu(II)GHK с различной координацией медного центра с экспериментальным спектром для комплекса Cu(II)GHK в водном буферном растворе и разностные спектры: для трехкоординированной модели (а), для четырехкоординированной модели (б), для пятикоординированной модели (в, з), для шестикоординированной модели (д)

Чтобы определить локальную атомную структуру комплекса Cu(II)GHK в водном растворе, были промоделированы несколько случаев локального атомного окружения меди (рис. 3). За основу моделирования брали структуру комплекса Cu(II)GHK, полученного методом рентгеновской дифракции на монокристалле [9]. Первая модель представляет собой мономер комплекса Cu(II)GHK без карбоксилатных групп и молекул растворителя, медный центр находится в окружении трех атомов азота (трехкоординированная модель) (см. рис. 3, а). Данная модель является грубым приближением структуры, однако при расчете спектров рентгеновского поглощения позволяет наглядно продемонстрировать чувствительность спектров к ближайшему окружению медного центра. Вторая модель, комплекс Cu(II)GHK с молекулой воды в экваториальной позиции (расстояние Cu—H<sub>2</sub>O составляет 1,97 Å), медь четырехкоординированная (см. рис. 3, б). Третья и четвертая модели представляют собой комплекс Cu(II)GHK с двумя молекулами воды в экваториальной и аксиальной позиции — медь пятикоординированная. Для данных моделей учитывается два варианта расположения аксиальной молекулы воды относительно плоскости медного центра в окружении трех атомов азота и экваториальной молекулы воды: молекула воды сверху (2,51 Å) (см. рис. 3, в) и молекула воды снизу (2,51 Å) (см. рис. 3, з). Пятая модель, комплекс Cu(II)GHK в окружении трех молекул воды (см. рис. 3, д).

Для рассмотренных моделей комплекса Cu(II)GHK рассчитаны спектры рентгеновского поглощения и проведено сравнение с экспериментальным спектром (см. рис. 3). Для всех теоретических спектров использовали стандартный критерий оценки подгонки относительно экспериментального спектра, для наглядности построены разностные спектры для каждой модели.

Теоретический спектр рентгеновского поглощения для трехкоординированной модели (см. рис. 3, а) имеет три основных спектральных особенности: предкраевую особенность А, особенность В и максимум С. Из разностного спектра для трехкоординированной модели и эксперимента видно, что основные отклонения приходятся на спектральную особенность В и область основного максимума С. Положение максимума предкраевой особенности А спектра для трехкоординированной модели совпадает с энергетическим положением предкраевой особенности А для экспериментального спектра, однако имеет большую интенсивность. Особен-

ности спектров для трехкоординированной модели (см. рис. 3, а) имеют три основных спектральных особенности: предкраевую особенность А, особенность В и максимум С. Из разностного спектра для трехкоординированной модели и эксперимента видно, что основные отклонения приходятся на спектральную особенность В и область основного максимума С. Положение максимума предкраевой особенности А спектра для трехкоординированной модели совпадает с энергетическим положением предкраевой особенности А для экспериментального спектра, однако имеет большую интенсивность. Особен-



ность *B* по энергетическому положению смещена примерно на 2 эВ вправо относительно экспериментального спектра и имеет вид более узкого пика с большей интенсивностью, чем плечо *B* экспериментального спектра. Положение основного максимума *C* совпадает с экспериментальным, но имеет меньшую интенсивность. Среднеквадратичное отклонение теоретического спектра рентгеновского поглощения для трехкоординированной модели относительно эксперимента составляет 0,083(5). Это значение характеризует недостаточное совпадение с экспериментом и является ожидаемым для данной модели, так как она не учитывает молекулы растворителя.

Для XANES спектра четырехкоординированной модели (см. рис. 3, б) наблюдается совпадение энергетического положения основных спектральных особенностей с экспериментальными значениями. Однако, как видно из разностного спектра, имеются небольшие отклонения для пиков *B* и *C*. Плечо *B* имеет большую интенсивность по сравнению с экспериментом. Основной максимум *C* совпадает по интенсивности, но является более узким. Среднеквадратичное отклонение для четырехкоординированной модели составляет 0,049(8), что почти в 2 раза лучше отклонения для трехкоординированной модели.

На рис. 3, в, г представлены теоретические спектры рентгеновского поглощения для пятикоординированной модели комплекса Cu(II)GHK. Для пятикоординированной модели с аксиальной молекулой воды в положении сверху (см. рис. 3, в) характерен сдвиг предкраевой особенности *A* и плеча *B* на 2 эВ вправо и совпадение энергетического положения основного максимума *C* с экспериментальным, тогда как для пятикоординированной модели с аксиальной молекулой воды в положении снизу (см. рис. 3, г) наблюдается совпадение энергетического положения всех трех спектральных особенностей. Для плеча *B* наблюдается увеличение интенсивности относительно экспериментального спектра, а для максимума *C* — сужение ширины основного максимума. Значения среднеквадратичного отклонения 0,048(7) и 0,041(4) для пятикоординированной модели с аксиальной молекулой воды в положении сверху и снизу соответственно.

Спектр рентгеновского поглощения для шестикоординированной модели комплекса Cu(II)GHK имеет отклонение 0,066(9). Для него наблюдается смещение основного максимума *C* влево и увеличение интенсивности плеча *B*.

Путем сравнения значений среднеквадратичного отклонения, энергетических положений и интенсивностей основных пиков для рассмотренных теоретических спектров рентгеновского поглощения для серии моделей комплекса Cu(II)GHK в водном растворе было отобрано две наиболее близких к экспериментальному спектру модели: четырехкоординированная модель (отклонение 0,049(8)) и пятикоординированная модель с аксиальной молекулой воды в положении снизу (отклонение 0,041(4)). Далее, для того чтобы оптимизировать структурные параметры отобранных моделей, было проведено варьирование расстояния молекул воды относительно поглощающего атома меди. Молекулы воды поочередно сдвигались на 0,05, 0,1, 0,2 Å в сторону увеличения и уменьшения расстояния Cu—H<sub>2</sub>O.

На рис. 4 представлены теоретические XANES спектры для моделей пептидного комплекса Cu(II)GHK при изменении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O для четырехкоординированной модели комплекса, как показано на схеме (а). Из XANES спектров следует, что при увеличении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O (см. рис. 4, б) наблюдается увеличение интенсивности плеча *B* и уменьшение интенсивности основного максимума. При уменьшении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O (см. рис. 4, в) наблюдается уменьшение интенсивности плеча *B* и сдвиг основного максимума *C* вправо. Из полученных значений среднеквадратичного отклонения можно сделать вывод, что сдвиг молекулы воды для данной модели не приводит к улучшению этой модели структуры (среднеквадратичное отклонение более 0,049(8)).

Результаты расчетов теоретических спектров рентгеновского поглощения для пятикоординированной модели при изменении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O в экваториальной и аксиальной позиции представлены на рис. 5. При увеличении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O в экваториальной позиции (см. рис. 5, б) наблюдается увеличение интенсивности плеча *B* и уменьшение интенсивности основного максимума. При уменьшении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O (см. рис. 5, в) наблюдается

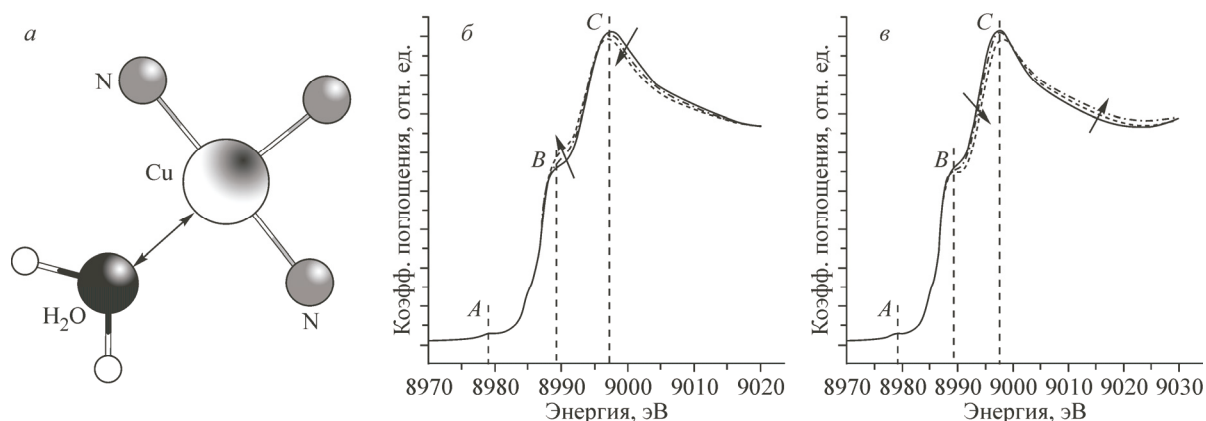


Рис. 4. Схема изменения расстояний Cu—H<sub>2</sub>O в четырехкоординированной модели пептидного комплекса Cu(II)GNK (а). Теоретические спектры рентгеновского поглощения для К-края меди(II) в пептидном комплексе Cu(II)GNK при увеличении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O на 0,05, 0,1, 0,2 Å (б); при уменьшении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O на 0,05, 0,1, 0,2 Å (в) по сравнению с полученной структурой четырехкоординированного комплекса

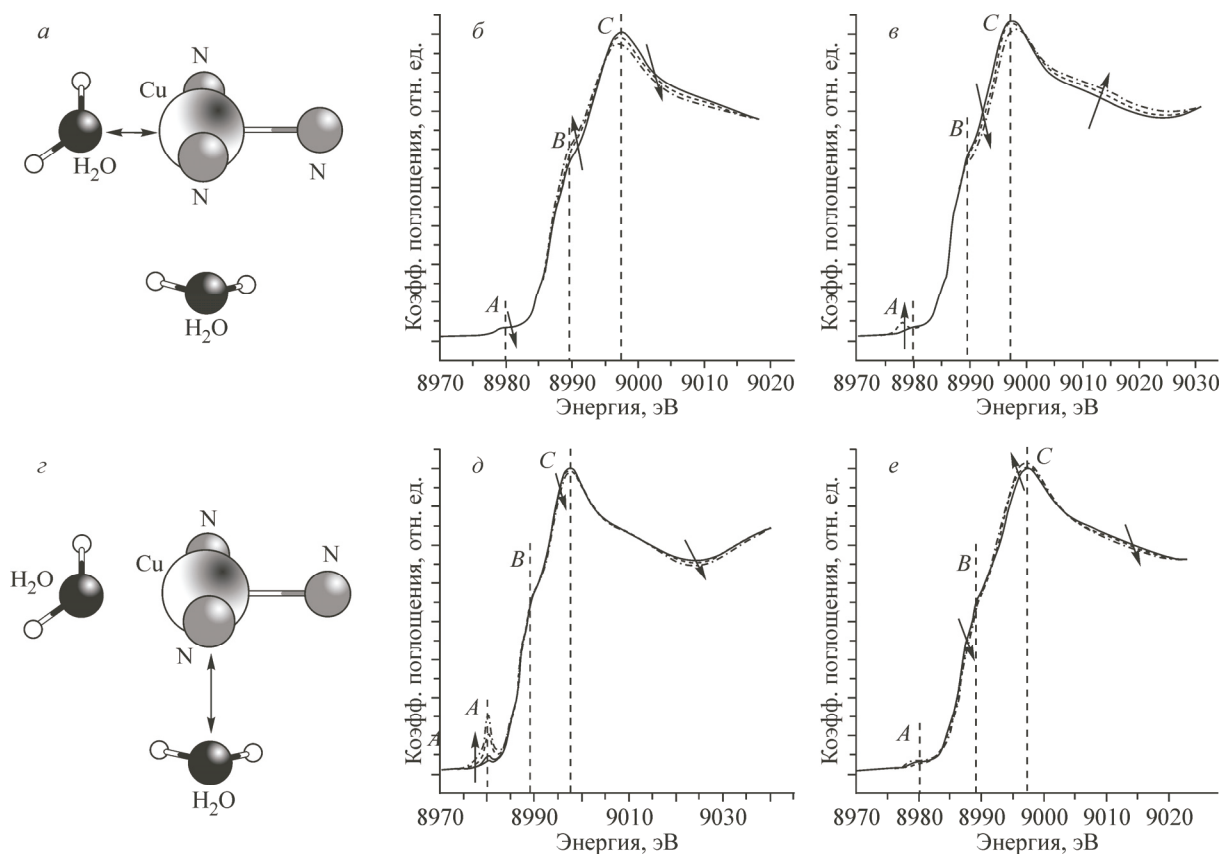


Рис. 5. Схема изменения расстояний Cu—H<sub>2</sub>O в пятикоординированной модели пептидного комплекса Cu(II)GNK (а, з). Теоретические спектры рентгеновского поглощения для К-края меди(II) в пептидном комплексе Cu(II)GNK при увеличении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O на 0,05, 0,1, 0,2 Å (б, д); при уменьшении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O на 0,05, 0,1, 0,2 Å (в, е) по сравнению с полученной структурой пятикоординированного комплекса

уменьшение интенсивности плеча *B*, сдвиг основного максимума *C* вправо, а также увеличение интенсивности предкраевой особенности *A* и ее сдвиг влево на величину порядка 1,5 эВ. Для случая увеличения расстояния Cu—H<sub>2</sub>O в аксиальной позиции (см. рис. 5, д) наблюдается рез-

кий рост интенсивности предкраевой особенности *A* и снижение интенсивности основного максимума *C* в диапазоне энергий 9015—9040 эВ. Изменений интенсивности в области плеча *B* не происходит. При уменьшении расстояния Cu—H<sub>2</sub>O (см. рис. 5, *e*) наблюдается незначительное уменьшение интенсивности плеча *B*, увеличение интенсивности основного максимума *C* и снижение интенсивности в послепороговой области 9005—9020 эВ. При сравнении значений среднеквадратичного отклонения для спектров пятикоординированной модели в рассмотренных примерах наилучшее значение получено для случая уменьшения расстояния Cu—H<sub>2</sub>O в аксиальной позиции на 0,2 Å (среднеквадратичное отклонение 0,031(5)), расстояние Cu—H<sub>2</sub>O составляет 2,31 Å.

По результатам проведенного моделирования атомного окружения медного центра Cu(II)GHK можно сделать вывод, что в водном растворе наилучшее согласие с экспериментом показывает пятикоординированная модель с молекулами воды в экваториальной и нижней аксиальной позиции (см. рис. 3, *z*).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были проведены измерения спектров рентгеновского поглощения для комплекса Cu(II)GHK в водном буферном растворе. Отдельное внимание уделялось проверке радиационного повреждения образца. Была построена серия моделей локальной структуры комплекса Cu(II)GHK: с трех-, четырех-, пяти- и шестикоординированным атомом меди. Для всех моделей были проведены расчеты спектров рентгеновского поглощения и проведен их теоретический анализ. В результате были выбраны две оптимальные модели, для которых была проведена оптимизация структурных параметров. Было установлено, что лучшее согласие с экспериментом показывает спектр пятикоординированной модели с молекулами воды в экваториальной и нижней аксиальной позиции с расстояниями Cu—O 1,97 и 2,31 Å соответственно.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-32-00568.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. et al.* // *Biomed. Pharmacother.* – 2003. – **57**. – P. 386.
2. *Cerpa W., Varela-Nallar L., Reyes A.E. et al.* // *Mol. Aspects Med.* – 2005. – **26**. – P. 405.
3. *Donnelly P.S., Xiao Z., Wedd A.G.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2007. – **11**. – P. 128.
4. *Bush A.I.* // *Trends Neurosci.* – 2003. – **26**. – P. 207.
5. *Pickart L.T. et al.* // *Nat. New Bio.* – 1973. – **243**. – P. 85.
6. *Trapaidze A., Hureau C., Bal W. et al.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2012. – **17**. – P. 37.
7. *Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A.* // *Biomed Res. Int.* – 2014. – P. 151479.
8. *Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A.* // *Cosmet.* – 2015. – **2**. – P. 236.
9. *Hureau C., Eury H., Guillot R. et al.* // *Chem. Eur. J.* – 2011. – **17**. – P. 10151.
10. *Guda S.A., Guda A.A., Soldatov M.A. et al.* // *J. Chem. Theory Comput.* – 2015. – **11**. – P. 4512.
11. *Kau L.S., Spira-Solomon D.J., Penner-Hahn J.E.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1987. – **109**. – P. 6433.