

УДК 577.112.34

О. А. МИЛАЧ¹, А. Л. КОЗЛОВА-КОЗЫРЕВСКАЯ²,
И. Л. ЮРКОВА^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ПРО/АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ Cu(II) МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка,
Минск, Беларусь

³НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Исследована способность биологически активных соединений акцептировать или опосредовать образование гидроксильных радикалов с помощью молекулярного зонда – терефталевой кислоты, образующей с HO[·] флуоресцентный продукт. Установлено, что цистеин и N-ацетилцистеин в сочетании с ионами Cu²⁺ или витамином B₁₂ (цианокобаламином) индуцируют образование HO[·]. Показано, что в условиях Cu²⁺ : H₂O₂ (0,05 : 5; 0,1 : 1 мМ)-опосредованного генерирования HO[·] в ряду серосодержащих аминокислот в диапазоне концентраций (0,005–10 мМ) высокую эффективность в акцептировании HO[·] однозначно проявляют метионин и метионинсульфоксид. Таурин обладает низкой антирадикальной активностью. Цистеин и N-ацетилцистеин при низких концентрациях (0,005–0,1 мМ) проявляют прооксидантные свойства, способствуя увеличению количества HO[·], при высоких – становятся эффективными антиоксидантами. Биогенный амин, дофамин, при малых дозах (0,0025–0,01 мМ) также стимулирует генерирование HO[·]. Данные результаты полезны для понимания прооксидантных и цитотоксичных свойств исследованных биологически активных соединений.

The ability of biologically active compounds to accept or mediate the formation of hydroxyl radicals by means of a molecular probe, which is the terephthalic acid able to generate together with HO[·] a fluorescent product, has been studied. It has been revealed that cysteine and N-acetylcysteine in combination with Cu²⁺ ions or vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) induce the formation of HO[·]. It has been shown that under the conditions of Cu²⁺ : H₂O₂ (0,05 : 5; 0,1 : 1 mM)-mediated generation of HO[·] methionine and methionine sulfoxide unambiguously manifest high efficiency in HO[·] acceptance in a series of sulfur-containing amino acids. Taurine has a low anti-radical activity. Cysteine and N-acetylcysteine at low concentrations of 0.005–0.1 mM exhibit prooxidant properties, promoting an increase in HO[·] amount. At high concentrations they become effective antioxidants. The biogenic amine dopamine also stimulates HO[·] generation at low doses of 0.0025–0.01 mM. These results are useful for understanding the prooxidant and cytotoxic properties of the studied biologically active compounds.

Ключевые слова: активные формы кислорода; серосодержащие аминокислоты; биотиолы; дофамин; про/антиоксидантная активность; ионы меди; флуоресцентные зонды; терефталевая кислота.

Keywords: reactive oxygen species; sulfur-containing amino acids; biothiols; dopamine; pro/antioxidant activity; copper ions; fluorescent probes; terephthalic acid.

Активные формы кислорода (АФК) (HO^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HClO) играют важную роль как в ряде физиологических функций, так и во многих патологиях [1]. АФК активно участвуют в процессах передачи внутриклеточных сигналов, запуске митогенного ответа [2]. Однако при чрезмерном накоплении в клетках АФК могут индуцировать процессы повреждения белков, липидов, ДНК и, как следствие, развитие окислительного стресса и различных заболеваний (воспаления, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, рак, диабет и др.) [1].

Среди АФК гидроксильный радикал является самой реакционноспособной и токсичной частицей, известной в настоящее время [3]. Данная радикальная частица обладает чрезвычайно высоким окислительно-восстановительным потенциалом ($E^\circ (\text{HO}^\cdot, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}) = 2,73 \text{ В}$, при $\text{pH } 7 E^\circ = 2,31 \text{ В}$) [1]. Радикалы HO^\cdot инициируют процессы деструкции важнейших биомолекул с высокой скоростью (10^9 – $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$) и играют решающую роль в развитии патологических процессов в биосистемах [1]. Сегодня нет никакой известной ферментативной реакции, способной детоксифицировать радикалы HO^\cdot *in vivo*. Один из путей образования HO^\cdot в организме – разложение H_2O_2 , катализируемое ионами переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.).

Медь является незаменимым микроэлементом, входит в состав более десяти ферментов, в организме находится в двух степенях окисления (I, II), преимущественно в форме Cu^{2+} [4]. В сыворотке крови большая часть (65–71 %) меди прочно связана с церулоплазмином, остальная – с альбумином и транскупреином. Однако примерно 2–5 % ионов меди находится в свободном и/или слабо связанном с аминокислотами (также относят к свободной фракции) виде. Ее количество может повышаться в результате приема пищевых добавок, в которых медь находится в составе неорганических соединений, или при нарушении гомеостаза меди. Несвязанные с белками ионы Cu^{2+} могут индуцировать образование частиц HO^\cdot в присутствии восстановителей. Увеличение содержания свободной меди связывают с развитием хронических нейродегенеративных растяжений (болезнь Альцгеймера и Паркинсона), патогенез которых сопряжен с окислительным стрессом [4].

Образование АФК в биосистемах контролируется эндо- и экзогенными соединениями – антиоксидантами (АО), действующими через различные механизмы [1]. Так, их антиоксидантные свойства могут проявляться через способность акцептировать АФК и/или связывать ионы Fe^{2+} (Cu^{2+}) в неактивный комплекс. Это приводит к снижению доли АФК, способных атаковать важней-

шие биологические молекулы. Однако роль АО не всегда однозначна. Некоторые АО, например природные тиолы (цистеин, глутатион) или катехоламины (дофамин, адреналин, норадреналин), могут проявлять прооксидантные свойства, интенсифицируя процессы окисления в клетках [5, 6].

Для выявления условий, в которых соединения могут проявлять про- или антиоксидантные свойства, необходимо использовать различные методы оценки их активности как *in vitro*, так и *in vivo*. Вследствие высокой реакционной способности HO[·] важной является оценка способности соединений акцептировать данные частицы и тем самым снижать вероятность свободнорадикальных повреждений компонентов клетки.

Метод флуоресцентных зондов позволяет детектировать короткоживущие активные частицы [7]. Он базируется на том, что взаимодействие АФК с определенными органическими веществами приводит либо к снижению их собственной флуоресценции, либо к образованию флуоресцирующих продуктов. Данный метод обладает высокой чувствительностью и прост в исполнении, что дает возможность проводить экспресс-оценку уровня АФК в системах и антирадикальной активности (APA) различных веществ.

Цель данной работы – изучение антиоксидантных свойств дофамина, серосодержащих аминокислот и их производных (таурина, *L*-метионина, *D,L*-метионин сульфоксида, *L*-цистеина, *N*-ацетил-*L*-цистеина) в присутствии ионов Cu²⁺ с помощью флуоресцентного зонда – терефталевой кислоты (ТФК).

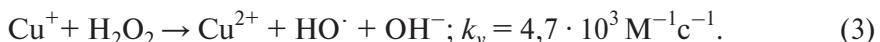
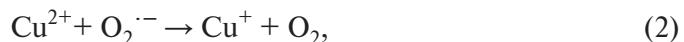
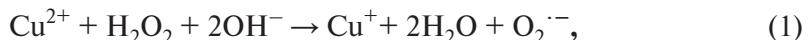
ТФК является специфичным и высокочувствительным детектором радикалов HO[·], она не реагирует с другими АФК (O₂^{·-}, ¹O₂, H₂O₂) [8, 9]. Вследствие симметричности молекулы ТФК (pK_{a1} = 3,51; pK_{a2} = 4,82) взаимодействует с HO[·] с образованием только одного моногидроксилированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ). Этот продукт является стабильным и, в отличие от ТФК, обладает способностью к флуоресценции ($\lambda_{воз}$ = 315 нм, $\lambda_{эм}$ = 418 нм). В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов HO[·] прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-ГТФ.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали *L*-цистеин (Цис), *N*-ацетил-*L*-цистеин (АЦЦ), таурин (Tay), *L*-метионин (Мет), *L*-метионин сульфоксид (MetSO), дофамина гидрохлорид, терефталевую кислоту (1,4-бензодикарбоновая кислота) фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия), а также витамин B₁₂ (раствор для инъекций, 500 мкг/1 мл) Борисовского завода медпрепаратов (Республика Беларусь). Маннитол, азид натрия, гидропероксид, диметилсульфоксид, CuSO₄ · 5H₂O были получены от ЗАО «Вектон» (Россия).

Водные растворы готовили на деионизированной воде. Для поддержания физиологического значения pH системы использовали 10 мМ (pH 7,4) фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Исходный 10 мМ раствор ТФК готовили путем растворения 0,0118 г кислоты в 25 мМ растворе NaOH.

При исследовании радикал-акцепторных свойств соединений генерирование частиц HO^{\cdot} в тест-системе осуществляли путем Cu^{2+} -катализируемого разложения гидропероксида. Образование HO^{\cdot} в редокс-системе $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ может протекать по реакциям [1]:



Тест-система для исследования АРА соединений имела следующий состав: ТФК : Cu^{2+} : $\text{H}_2\text{O}_2 = 0,06 : 0,05 : 5$; $0,06 : 0,1 : 1$ (мМ), фосфатно-солевой буфер (10 мМ, pH 7,4). Общий объем реакционной системы составлял 2 мл. Изначально готовили исходные более концентрированные растворы реагентов, а затем их аликовты добавляли в тест-систему для достижения необходимых концентраций компонентов.

При тестировании биологически активных соединений (БАС) строго соблюдали следующий порядок добавления растворов реагентов: ФСБ; ТФК; тестируемое соединение; CuSO_4 ; H_2O_2 . Для достижения однородности во всем объеме пробы после добавления каждого компонента растворы тщательно перемешивали на приборе «Vortex Mixer». Далее тест-системы инкубировали при комнатной температуре в течение 9 мин. Время с момента последнего перемешивания до измерения в каждой серии было одинаковым и отмечалось строго по секундомеру. Для тест-систем ТФК– Cu^{2+} и ТФК– B_{12} время от последнего перемешивания до измерения составляло 50 мин, 3 ч, 5 ч, 24 ч, 48 ч.

Спектры флуоресценции в диапазоне длин волн 350–550 нм получали на спектрофлуориметре «Solar CM2203», измеряя интенсивность эмиссии 2-ГТФ при 418 нм.

Антирадикальные свойства БАС (т. е. способность акцептировать HO^{\cdot}) оценивали по их влиянию на кинетику гидроксилирования ТФК и индексу IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования). Тестируемые вещества могут, как ТФК, взаимодействовать с радикалами HO^{\cdot} , что приводит к снижению концентрации 2-ГТФ и, следовательно, уменьшению интенсивности флуоресцентного сигнала. Для определения относительной константы скорости реакции ($k_{S, \text{HO}^{\cdot}}$) тестируемого соединения (S) с радикалами HO^{\cdot} использовали метод конкурирующих реакций. Константы $k_{S, \text{HO}^{\cdot}}$ рассчитывали по адаптированному уравнению Штерна–Фольмера, учитывая, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации 2-ГТФ:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{k_{S, \text{HO}^{\cdot}} [S]}{k_{\text{ТФК}, \text{HO}^{\cdot}} [\text{ТФК}]}, \quad (4)$$

где $[S]$ и $[\text{ТФК}]$ – концентрации соответственно тестируемого соединения и терефталевой кислоты; F_0 и F – интенсивность сигнала флуоресценции 2-ГТФ соответственно в отсутствие и в присутствии тестируемого соединения.

Экспериментальные данные обрабатывали путем построения графиков в координатах: $F - [S]$ или $(F_0/F - 1) - ([S]/[\text{ТФК}])$. По тангенсу угла наклона прямой $(F_0/F - 1) - ([S]/[\text{ТФК}])$, равному $(k_S, \text{но.})/(k_{\text{ТФК}}, \text{но.}) \cdot [\text{ТФК}]$, рассчитывали величину $k_S, \text{но.}$ с учетом того, что $k_{\text{ТФК}, \text{но.}} = 4,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [8].

Для расчета индекса IC_{50} уравнение (4) перегруппировывали и преобразовывали в логарифмическую зависимость, а затем получали прямую в координатах: $\log(F_0/F - 1) - \log[S]$. Концентрацию тестируемого вещества, при которой наблюдается уменьшение флуоресценции по сравнению с контролем в два раза (IC_{50}), получали при значении $\log(F_0/F - 1) = 0$ (если $F = 1/2F_0$, то $\log(F_0/F - 1) = 0$).

Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая встроенные в компьютер статистические функции программы «Excel» и «Origin». Достоверность полученных результатов контролировали с помощью *t*-теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3–5 параллельных опытов. На рисунках каждый результат представлен как среднее значение $\pm SD$, статистически отличное в сравнении с контролем ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке антиоксидантных свойств дофамина (2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламин) в присутствии ионов меди(II) его активность сравнивали с таковой для азива натрия (NaN_3) и маннита ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$). Последние широко используют в качестве эффективных акцепторов радикалов HO^\cdot [1]. Выбор маннита и азива в качестве референтных соединений объясняется их устойчивыми антиоксидантными свойствами в условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования HO^\cdot .

Дофамин (ДА), катехоламиновый трансмиттер, обладает антиоксидантными свойствами [10], но может оказывать нейротоксическое действие и вовлекаться в механизм развития нейродегенеративных процессов (болезнь Паркинсона, шизофрения, ишемия мозга и др.) [6]. Один из возможных механизмов нейротоксичности ДА заключается в том, что в процессе его окислительного метаболизма образуются АФК.

Антирадикальную активность азива и маннита исследовали в диапазоне концентраций 0,005–10 мМ, дофамина – 0,0025–10 мМ. В присутствии азива и маннита флуоресценция в тест-системе устойчиво снижалась с увеличением их концентрации, как показано на рис. 1 для азива (для наглядности приводится только начальный фрагмент зависимости). Это однозначно указывает на их способность акцептировать HO^\cdot в присутствии ионов Cu^{2+} .

Активность ДА была неоднозначна, а именно при его концентрации 0,0025–0,01 мМ флуоресценция в тест-системе возрастала и достигала своего максимума (рис. 2). Это указывает на то, что ДА способствует увеличению количества частиц HO^\cdot в системе. При исследовании БАС в тест-системе

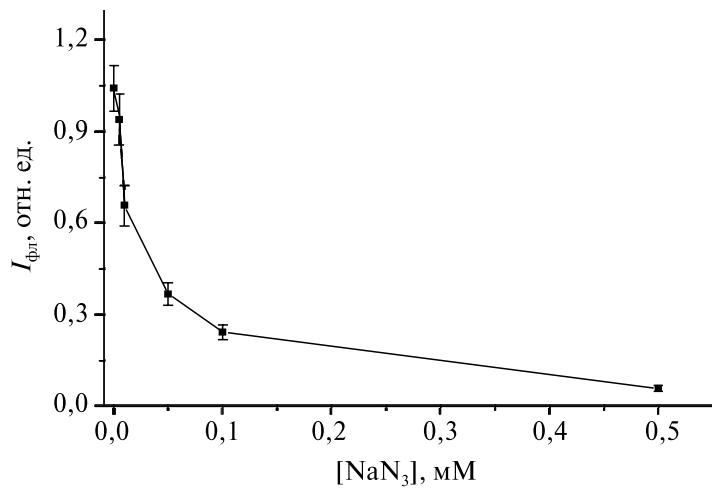


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации азода натрия в тест-системе
ТФК : Cu²⁺ : H₂O₂ = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

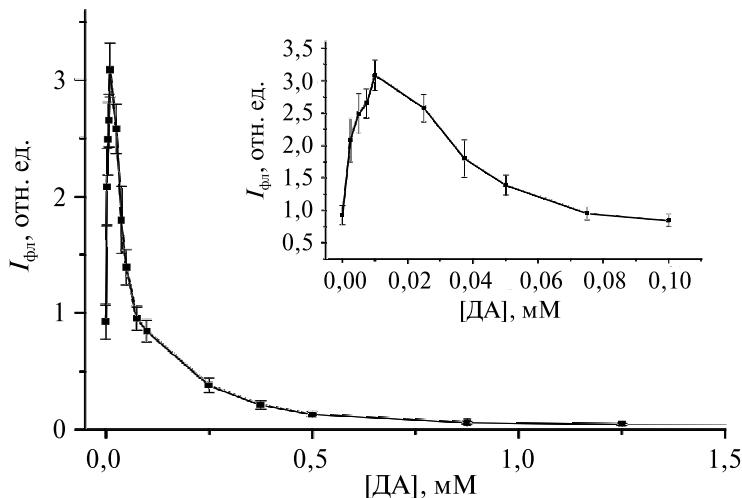


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации дофамина в тест-системе
ТФК : Cu²⁺ : H₂O₂ = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

ТФК : Cu²⁺ : H₂O₂ = 0,06 : 0,05 : 5 (мМ) наблюдали схожие зависимости интенсивности флуоресценции от их концентрации.

Такое поведение ДА можно объяснить тем, что в присутствии ионов меди(II) и кислорода воздуха происходит его окисление в о-хинон с образованием H₂O₂ и Cu⁺, которые будут усиливать генерирование HO[·] в тест-системе.

Окисление ДА может проходить через стадию образования комплекса Cu^{2+} – ДА [11]. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в соответствии с которыми присутствие ионов переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^{2+}) ускоряет окисление ДА и увеличивает его токсичность [11].

При более высоких концентрациях ДА, как и ТФК, активно взаимодействует с HO^- , тем самым проявляя АРА.

Для маннита, ДА и азида величины индексов IC_{50} составили соответственно 0,2; 0,11 и 0,097 мМ, а значения $k_S, \text{но}^- = 1,8 \cdot 10^9, 4,9 \cdot 10^9$ и $8,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Значения последних находятся в хорошем соответствии с литературными данными, а именно $1,8 \cdot 10^9, 5,9 \cdot 10^9$ (рН 4,7) и $1,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ соответственно [12]. Указанные параметры определяли в области концентраций 0,1–10 мМ, в которой интенсивность флуоресценции тест-системы отчетливо снижалась в присутствии ДА. При выбранных условиях активность ДА такая же, как у NaN_3 , но в ~2 раза превышает активность маннита.

При изучении АРА серосодержащих аминокислот и их производных в присутствии ионов Cu^{2+} в качестве референтного соединения был выбран диметилсульфоксид (ДМСО). Последний эффективно акцептирует гидроксильные радикалы и служит молекулярным зондом для их детектирования [13]. Активность всех соединений тестировали в области концентраций 0,005–10 мМ, для Tay этот диапазон находился в пределах 0,005–100 мМ.

В выбранных условиях эксперимента снижение флуоресценции тест-системы в присутствии ДМСО наблюдали для всего исследуемого диапазона концентраций. Для ДМСО получены низкий $IC_{50} = 0,1$ мМ и большая $k_S, \text{но}^- = 5,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ($6,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [12]), что указывает на его высокую эффективность в качестве АО в присутствии ионов Cu^{2+} .

При тестировании активности тиоэфира Мет и его сульфоксида установлено, что они по своей АРА превосходят ДМСО в выбранных условиях. Мет и MetSO имеют низкие величины индексов IC_{50} , равные 0,075 и 0,046 мМ соответственно, и высокие значения $k_S, \text{но}^- = 1,8 \cdot 10^{10}$ и $2,0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Последние согласуются с литературными данными [14], для обоих соединений $k_S, \text{но}^-$ составляет $\sim 1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Отличие можно объяснить различиями в выбранных условиях эксперимента. Результаты по высокой активности Мет и MetSO согласуются с данными о том, что их остатки в составе белков чрезвычайно чувствительны к действию АФК [15, 16].

Сульфокислота Tay в сравнении с Мет и MetSO проявляет слабую способность акцептировать радикалы HO^- , что видно из зависимости интенсивности флуоресценции тест-системы от концентрации аминокислоты (рис. 3).

Tay имеет высокий индекс $IC_{50} = 45$ мМ и низкую константу $k_S, \text{но}^- = 1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, что соответствует ее литературному значению, равному $1,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [17]. Tay слабо ингибирует свободнорадикальные процессы деструкции биомолекул, индуцированные частицами HO^- [18]. Эффективное антиоксидантное действие Tay скорее реализуется не по радикал-акцепторным, а по иным механизмам [19]. Влияние тиолов (RSH), Цис и его

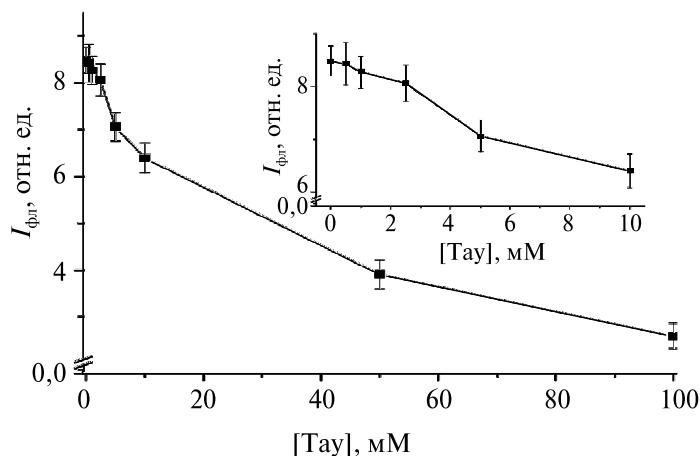


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации таурина в тест-системе
ТФК : Cu^{2+} : H_2O_2 = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

N-ацетилированного производного АЦЦ на скорость гидроксилирования ТФК неоднозначно. Это следует из зависимости флуоресценции системы ТФК : Cu^{2+} : H_2O_2 от концентрации Цис (рис. 4). Для АЦЦ данная зависимость имела аналогичный характер. В диапазоне концентраций тиолов 0,005–0,1 мМ интенсивность флуоресценции тест-системы отчетливо возрастает, достигает своего максимума, а затем снижается. Для тест-системы ТФК : Cu^{2+} : H_2O_2 = 0,06 : 0,05 : 5 (мМ) наблюдали схожие зависимости.

Результаты указывают на то, что Цис и АЦЦ, как и ДА, в условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования HO^\cdot способны проявлять как прооксидантные, так и антиоксидантные свойства, что, по-видимому, определяется соотношением $[\text{S}] : \text{Cu}^{2+}$.

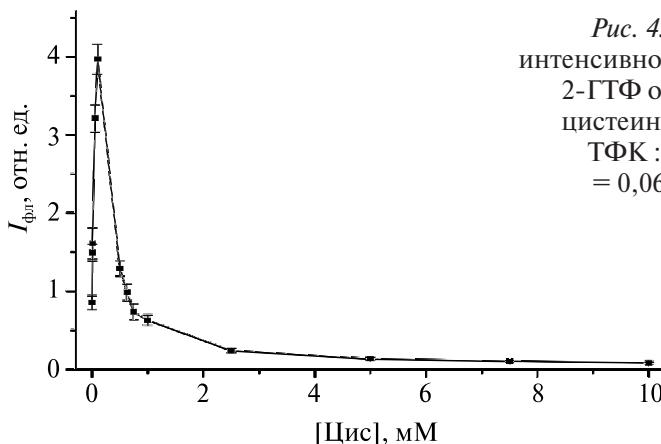


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации цистеина в тест-системе
ТФК : Cu^{2+} : H_2O_2 = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

Для Цис и АЦЦ получены достаточно высокие величины индекса IC_{50} (1,2 и 0,76 мМ соответственно). Хотя известно, что тиолы реагируют с HO^{\cdot} с высокой константой скорости (для Цис – $3,4 \cdot 10^{10}$, для АЦЦ – $1,36 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [14, 20]). Рассчитанные в работе значения k_S , но для Цис и АЦЦ ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$) значительно ниже литературных. Это также может указывать на более сложные процессы с участием тиолов в присутствии ионов Cu^{2+} (например, комплексообразование) и требует дальнейшего углубленного изучения.

Прооксидантное действие Цис и АЦЦ, видимо, обусловлено нуклеофильными свойствами SH-групп. Цис восстанавливает $\text{Cu}(\text{II})$ до одновалентной и тем самым способствует ускорению разложения H_2O_2 и, следовательно, повышению уровня HO^{\cdot} . Надо отметить, что Цис и АЦЦ в нейтральной среде практически не взаимодействуют с H_2O_2 (константы скоростей 1–4 и $0,16 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ соответственно) [21].

Исследовали также прооксидантные свойства Цис и АЦЦ с помощью тест-систем ТФК– Cu^{2+} и ТФК– B_{12} , в которые не вводили H_2O_2 . При добавлении АЦЦ и Цис в тестах возникает флуоресценция, что свидетельствует об образовании 2-ГТФ (рис. 5). Наибольшую интенсивность флуоресценции, а следовательно, уровень гидроксильных радикалов наблюдали для смесей АЦЦ : Cu^{2+} (0,1 : 0,05 мМ) и Цис : Cu^{2+} (0,1 : 0,05 мМ).

В нормальных клетках АО призваны регулировать количество АФК, так как последние при их чрезмерном генерировании способствуют развитию патологий, включая канцерогенез. Прооксидантная активность АО будет способствовать увеличению количества АФК и усугублять деструктивные процессы. Однако такая активность БАС может быть использована для АФК-опосредованной индукции апоптоза (программируемая клеточная гибель) в раковых клетках, где он подавлен. В настоящее время роли АФК в таргетной терапии рака, особенно химиорезистентного, уделяется все больше внимания [22, 23].

В работе [24] показано, что смесь АЦЦ : $\text{Cu}(\text{II})$, в отличие от АЦЦ : $\text{Fe}(\text{III})$ и АЦЦ : $\text{Zn}(\text{II})$, значительно снижает рост раковых клеток. Тиолы АЦЦ и глутатион в физиологических концентрациях при совместном применении

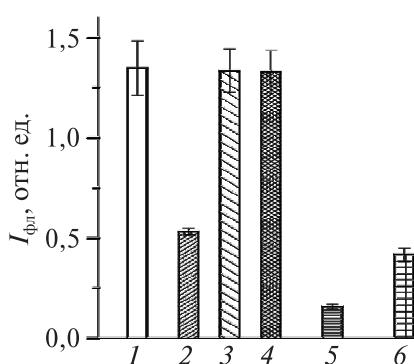


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции 2-ГТФ в тест-системе (0,06 мМ ТФК, 10 мМ ФСБ, pH 7,4) в присутствии различных соединений (время инкубирования 48 ч при 25 °C):
 1 – 0,1 : 0,05 мМ, смесь Цис : Cu^{2+} ;
 2 – 0,05 : 0,05 мМ; 3 – 0,1 : 0,05 мМ;
 4 – 1,0 : 0,05 мМ, смесь АЦЦ : Cu^{2+} ;
 5 – 1,0 : 0,05 мМ; 6 – 2,0 : 0,02 мМ, смесь АЦЦ : B_{12}

с витамином В₁₂ также инициируют апоптоз в раковых клетках [25]. Такое противоопухолевое действие тиолов в комбинации с ионами Cu²⁺ или В₁₂ связывают с образованием H₂O₂, что может вызывать внутриклеточный окислительный стресс и нарушение редокс-баланса клеток [24, 25].

Исходя из наших результатов токсичное действие Цис и АЦЦ в присутствии ионов переходных металлов и кислорода воздуха может объясняться образованием чрезвычайно активных гидроксильных радикалов, способных индуцировать деструкцию биомолекул и тем самым опосредовать окислительный стресс. В целом образование HO· в смеси Цис или АЦЦ с ионами меди(II) можно объяснить тем, что тиолы окисляются медью(II) с образованием тиильных радикалов (RS·) и меди(I). Радикалы RS· могут быстро димеризоваться с образованием RSSR [14]. Кроме того, в присутствии кислорода воздуха возможен перенос электрона с радикала RS· на O₂ с образованием супероксид анион-радикала (O₂·⁻). Частицы O₂·⁻ трансформируются в H₂O₂. Последний может разлагаться в присутствии ионов Cu⁺ с образованием HO·. Авторы работы [26] также предполагают, что токсичное действие АЦЦ в присутствии ионов меди обусловлено образованием радикалов HO·.

Схожий механизм может реализоваться в случае бинарной смеси АЦЦ : В₁₂. В результате окисления АЦЦ в присутствии В₁₂ и кислорода воздуха может образовываться H₂O₂. Витамин В₁₂ (цианокобаламин) представляет собой органический комплекс ионов кобальта, который является переходным металлом и, вероятно, в составе комплекса может катализировать разложение H₂O₂ с образованием радикалов HO· в реакциях типа Фентона [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью флуоресцентного зонда (терефталевой кислоты) проведена сравнительная экспресс-оценка способности БАС акцептировать или опосредовать образование гидроксильных радикалов в присутствии ионов Cu²⁺.

Показано, что цистеин и N-ацетилцистеин в сочетании с Cu²⁺ или витамином В₁₂ (цианокобаламином) способны индуцировать образование радикалов HO·.

Установлено, что в условиях Cu²⁺/H₂O₂-опосредованного генерирования радикалов HO· в ряду серосодержащих аминокислот высокую эффективность в акцептировании HO· однозначно проявляют Мет и MetSO. Сульфокислота Tay обнаруживает самый высокий индекс IC₅₀ и низкую относительную константу скорости k_s, но, что указывает на слабые радикал-акцепторные свойства. Тиолы цистеин и N-ацетилцистеин при низких концентрациях проявляют прооксидантные свойства, способствуя увеличению количества частиц HO·, при высоких – становятся эффективными антиоксидантами. Катехоламин, дофамин в малых дозах также стимулируют генерирование частиц HO·.

Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия дофамина и серосодержащих аминокислот в развитии и регулировании

ния окислительного стресса в биосистемах, необходимы для решения практических задач, связанных с оптимизацией антиоксидантной фармакотерапии патологий, обусловленных действием активных форм кислорода, и разработкой эффективных противоопухолевых препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine, fourth edition. Oxford : University press, 2012.
2. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // J. Cell Biol. 2011. Vol. 194, № 1. P. 7–15.
3. Gligorovski S., Strekowski R., Barbat S. [et al.]. Environmental implications of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) // Chem. Rev. 2015. Vol. 115, № 24. P. 13051–13092.
4. Manto M. Abnormal copper homeostasis: mechanisms and roles in neurodegeneration toxics // 2014. Vol. 2. P. 327–345.
5. Sagrista M. L., Garcia A. E., Africa de Madariaga M. [et al.]. Antioxidant and prooxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation // Free Radic. Res. 2002. Vol. 36, № 3. P. 329–340.
6. Pedrosa R., Soares-da-Silva P. Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 137. P. 1305–1313.
7. Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biochem. Biophys. Methods. 2005. Vol. 65. P. 45–80.
8. Page S. E., Arnold W. A., McNeill K. Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical // J. Environ. Monit. 2010. Vol. 9, № 12. P. 1658–1665.
9. Son Y. A., Mishin V., Welsh W. [et al.]. Novel high-throughput approach to measure hydroxyl radicals induced by airborne particulate matter // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2015. Vol. 12. P. 13678–13695.
10. Jodko-Piórecka K., Litwinienko G. Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of α -tocopherol // Free Radic. Biol. Med. 2015. Vol. 83. P. 1–11.
11. Paris I., Dagnino-Subiabre A., Marcelain K. [et al.]. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper up take and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line // J. Neurochem. 2001. Vol. 77, № 2. P. 519–529.
12. Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P. [et al.]. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\text{O}^-$) in aqueous solution // J. Phys. Chem. Reference Data. 1988. Vol. 17, № 2. P. 676–777.
13. Melissa G., Steiner C., Babbs F. Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide // Arch. Biochem. Biophys. 1990. Vol. 278, № 2. P. 478–481.
14. Davies M. J., Dean R. T. Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine. Oxford : University Press Inc., 1997.
15. Levine R. L., Moskovitz J., Stadtan E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation // IUBMB Life. 2000. Vol. 50. P. 301–307.
16. Nakao L. S., Iwai L. K., Kalil J. [et al.]. Radical production from free and peptide-bound methionine sulfoxide oxidation by peroxy nitrite and hydrogen peroxide/iron (II) // FEBS Letters. 2003. Vol. 547, № 1. P. 87–91.

17. Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B. M. [et al.]. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors // Biochem. J. 1988. Vol. 256. P. 251–255.
18. Shi X., Flynn D. C., Porter D. W. [et al.]. Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation // Ann. Clin. Lab Sci. 1997. Vol. 27. P. 365–374.
19. Huxtable R. J. Physiologic actions of taurine // Physiol. Rev. 1992. Vol. 72. P. 101–163.
20. Aruoma O. I., Bomford A., Polson R. J. [et al.]. The antioxidant action of N-acetylcysteine: with hydrogen peroxide, hydroxyl radical and hypochlorous acid // Free Radic. Biol. Med. 1989. Vol. 6, № 6. P. 593–596.
21. Winterbourn C. C., Metodiewa C. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and H_2O_2 // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 27. P. 322–328.
22. Zou Z., Chang H., Li H. [et al.]. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy // Apoptosis. 2017. Vol. 22, № 11. P. 1321–1335.
23. Preedy V. R. Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. London : Academic Press, 2014.
24. Zheng J., Lou J. R., Zhang X.-X. [et al.]. N-acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death // Cancer Res. 2010. Vol. 298. P. 186–194.
25. Solov'eva M. E., Solov'ev V. V., Fashkutdinova A. A. [et al.]. Prooxidant and cytotoxic action of N-acetylcysteine and glutathione in combinations with vitamin B_{12b} // Cell and Tissue Biology. 2007. Vol. 1, № 3. P. 40–49.
26. Thibodeau P. A., Kocsis-Bédard S., Courteau J. [et al.]. Thiols can either enhance or suppress DNA damage induction by catecholestrogens // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 30, № 1. P. 62–73.
27. Vol'pin M. E., Krainova N. Yu., Moskaleva I. V. [et al.]. Transition-metal complexes as catalysts of active oxygen species formation in autoxidation reactions. 1. Cobalt and iron phthalocyanine complexes // Russ. Chem. Bull. 1996. Vol. 45. P. 2000–2007.

Поступила в редакцию 08.07.2018