

УДК 577.112.34

О. А. МИЛАЧ<sup>1</sup>, А. Л. КОЗЛОВА-КОЗЫРЕВСКАЯ<sup>2</sup>,  
И. Л. ЮРКОВА<sup>1,3</sup>

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

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка,  
Минск, Беларусь

<sup>3</sup>НИИ 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 Cu<sup>2+</sup> или витамином B<sub>12</sub> (цианокобаламином) индуцируют образование HO·. Показано, что в условиях Cu<sup>2+</sup> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 Cu<sup>2+</sup> ions or vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin) induce the formation of HO·. It has been shown that under the conditions of Cu<sup>2+</sup> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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) ( $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$ ) 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 реакционно-способной 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  $\text{HO}^\cdot$  инициируют процессы деструкции важнейших биомолекул с высокой скоростью ( $10^9\text{--}10^{10} \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ) и играют решающую роль в развитии патологических процессов в биосистемах [1]. Сегодня нет никакой известной ферментативной реакции, способной детоксифицировать радикалы  $\text{HO}^\cdot$  *in vivo*. Один из путей образования  $\text{HO}^\cdot$  в организме — разложение  $\text{H}_2\text{O}_2$ , катализируемое ионами переходных металлов ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  и др.).

Медь является незаменимым микроэлементом, входит в состав более десяти ферментов, в организме находится в двух степенях окисления (I, II), преимущественно в форме  $\text{Cu}^{2+}$  [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  $\text{Cu}^{2+}$  могут индуцировать образование частиц  $\text{HO}^\cdot$  в присутствии восстановителей. Увеличение содержания свободной меди связывают с развитием хронических нейродегенеративных растройств (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  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 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  $\text{HO}^\cdot$  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 (АРА) 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  $\text{Cu}^{2+}$  с помощью флуоресцентного зонда — терефталевой кислоты (ТФК).

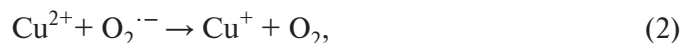
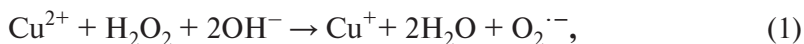
ТФК является специфичным и высокочувствительным детектором радикалов  $\text{HO}^\cdot$ , она не реагирует с другими АФК ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [8, 9]. Вследствие симметричности молекулы ТФК ( $\text{pK}_{a1} = 3,51$ ;  $\text{pK}_{a2} = 4,82$ ) взаимодействует с  $\text{HO}^\cdot$  с образованием только одного моногидроксилированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ). Этот продукт является стабильным и, в отличие от ТФК, обладает способностью к флуоресценции ( $\lambda_{\text{воз}} = 315 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{эм}} = 418 \text{ нм}$ ). В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов  $\text{HO}^\cdot$  прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-ГТФ.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали *L*-цистеин (Цис), *N*-ацетил-*L*-цистеин (АЦЦ), таурин (Тау), *L*-метионин (Мет), *L*-метионин сульфоксид (МетSO), дофамина гидрохлорид, терефталевую кислоту (1,4-бензолдикарбоновая кислота) фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия), а также витамин  $\text{B}_{12}$  (раствор для инъекций, 500 мкг/1 мл) Борисовского завода медпрепаратов (Республика Беларусь). Маннитол, азид натрия, гидропероксид, диметилсульфоксид,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{HO}^\cdot$  в тест-системе осуществляли путем  $\text{Cu}^{2+}$ -катализируемого разложения гидропероксида. Образование  $\text{HO}^\cdot$  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 :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 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 аликвоты 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;  $\text{CuSO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 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– $\text{Cu}^{2+}$  и ТФК– $\text{V}_{12}$  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  $\text{HO}^\cdot$ ) оценивали по их влиянию на кинетику гидроксирования ТФК и индексу  $IC_{50}$  (концентрация полумаксимального ингибирования). Тестируемые вещества могут, как ТФК, взаимодействовать с радикалами  $\text{HO}^\cdot$ , 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  $\text{HO}^\cdot$  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 [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  $(k_{S, \text{НО}} / (k_{\text{ТФК}, \text{НО}} [\text{ТФК}]))$ , рассчитывали величину  $k_{S, \text{НО}}$  с учетом того, что  $k_{\text{ТФК}, \text{НО}} = 4,4 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [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  $F = 1/2 F_0$ , 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 азидата натрия ( $\text{NaN}_3$ ) и маннита ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ). Последние широко используют в качестве эффективных акцепторов радикалов  $\text{НО}^\cdot$  [1]. Выбор маннита и азидата в качестве референтных соединений объясняется их устойчивыми антиоксидантными свойствами в условиях  $\text{Cu}^{2+}$ -опосредованного генерирования  $\text{НО}^\cdot$ .

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

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  $\text{НО}^\cdot$  в системе. При исследовании БАС в тест-системе

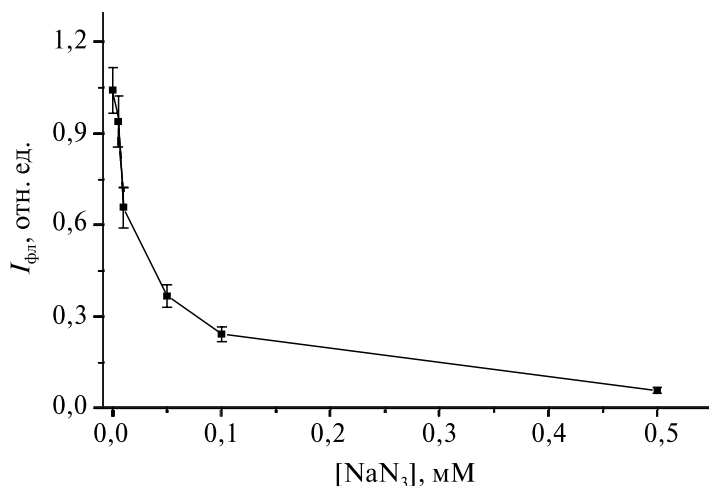


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации азид натрия в тест-системе  
ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

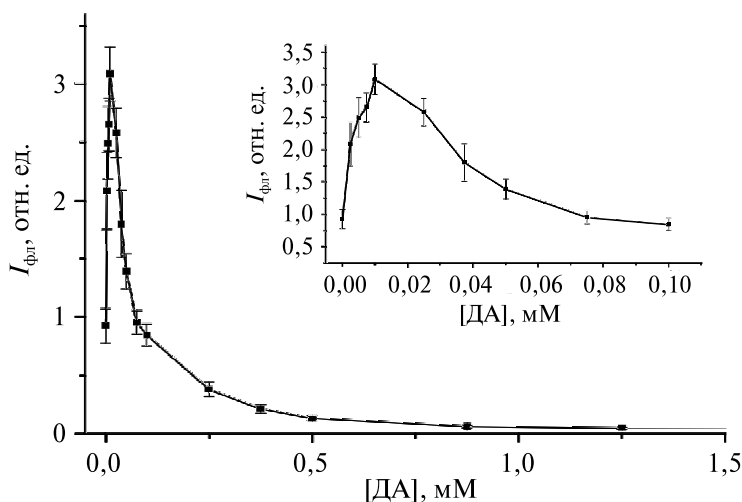


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации дофамина в тест-системе  
ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{Cu}^+$ , которые будут усиливать генерирование  $\text{HO}^\cdot$  в тест-системе.



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

При более высоких концентрациях ДА, как и ТФК, активно взаимодействует с  $\text{HO}^\cdot$ , 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  $k_{S, \text{HO}^\cdot}$  –  $1,8 \cdot 10^9$ ,  $4,9 \cdot 10^9$  и  $8,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . 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  $1,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  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  $\text{NaN}_3$ , но в ~2 раза превышает активность маннита.

При изучении АРА серосодержащих аминокислот и их производных в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  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 Тау 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  $k_{S, \text{HO}^\cdot} = 5,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $6,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [12]), что указывает на его высокую эффективность в качестве АО в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

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

Сульфокислота Тау в сравнении с Мет и МетSO проявляет слабую способность акцептировать радикалы  $\text{HO}^\cdot$ , что видно из зависимости интенсивности флуоресценции тест-системы от концентрации аминокислоты (рис. 3).

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

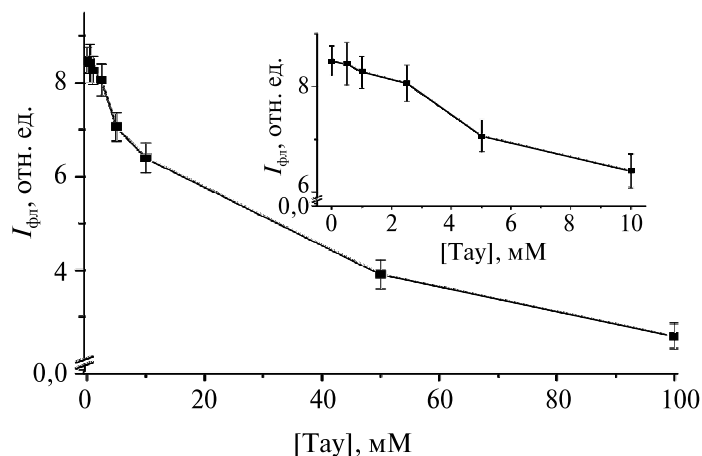


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации таурина в тест-системе ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)

N-ацетилированного производного АЦЦ на скорость гидроксилирования ТФК неоднозначно. Это следует из зависимости флуоресценции системы ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 0,06 : 0,05 : 5 (мМ) наблюдали схожие зависимости.

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

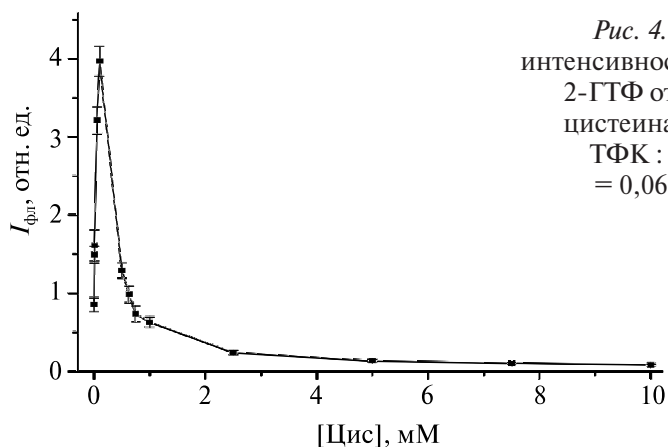


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-ГТФ от концентрации цистеина в тест-системе ТФК :  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 0,06 : 0,1 : 1 (мМ)



Для Цис и АЦЦ получены достаточно высокие величины индекса  $IC_{50}$  (1,2 и 0,76 мМ соответственно). Хотя известно, что тиолы реагирует с  $HO\cdot$  с высокой константой скорости (для Цис —  $3,4 \cdot 10^{10}$ , для АЦЦ —  $1,36 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [14, 20]). Рассчитанные в работе значения  $k_{S, HO\cdot}$  для Цис и АЦЦ ( $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) 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 Cu(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  $0,16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  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 : Cu(II), в отличие от АЦЦ : Fe(III) и АЦЦ : Zn(II), значительно снижает рост раковых клеток. Тиолы АЦЦ и глутатион в физиологических концентрациях при совместном применении

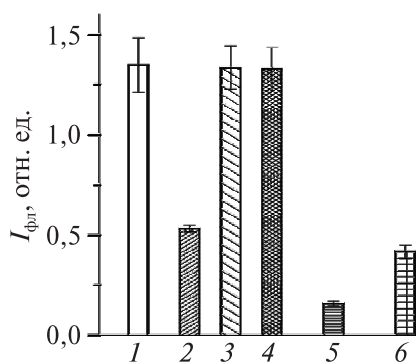


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции 2-ГТФ в тест-системе (0,06 мМ ТФК, 10 мМ ФСБ, pH 7,4) в присутствии различных соединений (время инкубирования 48 ч при 25 °C):  
1 — 0,1 : 0,05 мМ, смесь Цис :  $Cu^{2+}$ ;  
2 — 0,05 : 0,05 мМ;  
3 — 0,1 : 0,05 мМ;  
4 — 1,0 : 0,05 мМ, смесь АЦЦ :  $Cu^{2+}$ ;  
5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

с витамином  $V_{12}$  также инициируют апоптоз в раковых клетках [25]. Такое противоопухолевое действие тиолов в комбинации с ионами  $Cu^{2+}$  или  $V_{12}$  связывают с образованием  $H_2O_2$ , 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  $HO^\cdot$  в смеси Цис или АЦЦ с ионами меди(II) можно объяснить тем, что тиолы окисляются медью(II) с образованием тиильных радикалов ( $RS^\cdot$ ) и меди(I). Радикалы  $RS^\cdot$  могут быстро димеризоваться с образованием  $RSSR$  [14]. Кроме того, в присутствии кислорода воздуха возможен перенос электрона с радикала  $RS^\cdot$  на  $O_2$  с образованием супероксид анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ). Частицы  $O_2^{\cdot-}$  трансформируются в  $H_2O_2$ . Последний может разлагаться в присутствии ионов  $Cu^+$  с образованием  $HO^\cdot$ . Авторы работы [26] также предполагают, что токсичное действие АЦЦ в присутствии ионов меди обусловлено образованием радикалов  $HO^\cdot$ .

Схожий механизм может реализоваться в случае бинарной смеси АЦЦ :  $V_{12}$ . В результате окисления АЦЦ в присутствии  $V_{12}$  и кислорода воздуха может образовываться  $H_2O_2$ . Витамин  $V_{12}$  (цианокобаламин) представляет собой органический комплекс ионов кобальта, который является переходным металлом и, вероятно, в составе комплекса может катализировать разложение  $H_2O_2$  с образованием радикалов  $HO^\cdot$  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  $Cu^{2+}$ .

Показано, что цистеин и N-ацетилцистеин в сочетании с  $Cu^{2+}$  или витамином  $V_{12}$  (цианокобаламином) способны индуцировать образование радикалов  $HO^\cdot$ .

Установлено, что в условиях  $Cu^{2+}/H_2O_2$ -опосредованного генерирования радикалов  $HO^\cdot$  в ряду серосодержащих аминокислот высокую эффективность в акцептировании  $HO^\cdot$  однозначно проявляют Мет и МетSO. Сульфокислота Тау обнаруживает самый высокий индекс  $IC_{50}$  и низкую относительную константу скорости  $k_{S, HO^\cdot}$ , что указывает на слабые радикал-акцепторные свойства. Тиолы цистеин и N-ацетилцистеин при низких концентрациях проявляют прооксидантные свойства, способствуя увеличению количества частиц  $HO^\cdot$ , при высоких — становятся эффективными антиоксидантами. Катехоламин, дофамин в малых дозах также стимулируют генерирование частиц  $HO^\cdot$ .

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

нии 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., Barbati 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  $\alpha$ -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 ( $\cdot\text{OH}/\text{O}\cdot$ ) 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., Stadtman 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 peroxynitrite 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., Faskhutdinova 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 autooxidation reactions. 1. Cobalt and iron phthalocyanine complexes // *Russ. Chem. Bull.* 1996. Vol. 45. P. 2000–2007.

Поступила в редакцию 08.07.2018