

УДК 577.112.34+577.334+544.431.15

О. А. МИЛАЧ<sup>1</sup>, Е. Н. БОГУМИЛЬЧИК<sup>1</sup>,  
И. Л. ЮРКОВА<sup>1,2</sup>**НЕПРОТЕИНОГЕННЫЕ БЕТА-АМИНОКИСЛОТЫ  
В РЕГУЛИРОВАНИИ  
Cu<sup>2+</sup>(Fe<sup>2+</sup>)-ОПОСРЕДОВАННОГО  
ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ГЛИЦЕРОФОСФАТА**<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь<sup>2</sup>НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета,  
Минск, Беларусь

Изучено влияние таурина, гипотаурина, β-аланина и α-аланина на гомолитическую деструкцию глицерофосфата (ГФ) с разрывом фосфоэфирной связи, индуцированную системами Fe<sup>2+</sup>(Cu<sup>2+</sup>)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Показано, что в условиях Cu<sup>2+</sup>-опосредованного генерирования HO· β-Ала интенсифицирует процесс, наибольший эффект наблюдается при молярном соотношении аминокислота : Cu<sup>2+</sup> > 10 : 1. α-Ала активизирует дефосфорилирование ГФ при соотношении АА : Cu<sup>2+</sup> от 1,5 : 1 до 3 : 1, повышенные соотношения до 10 : 1 приводит к инверсии эффекта, уровень фосфат-аниона снижается. В случае Fe<sup>2+</sup>-опосредованной фрагментации аланины значимым образом не влияют на накопление продукта фрагментации. При этом азид натрия и ДМСО, эффективные HO·-акцепторы, ингибируют фрагментацию в концентрационно-зависимой манере. Таурин в исследованном диапазоне концентраций не оказывает значимого эффекта на Cu<sup>2+</sup>(Fe<sup>2+</sup>)-опосредованную деструкцию ГФ. Гипотаурин, напротив, оказывает протекторное действие, которое усиливается с ростом его концентрации в системе.

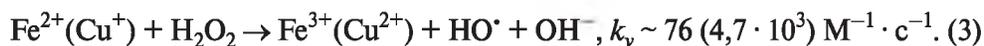
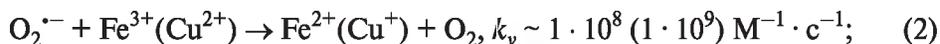
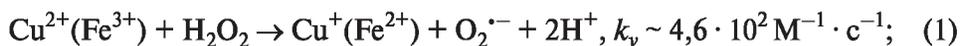
The effect of taurine, hypotaurine, β-alanine, and α-alanine on homolytic destruction of glycerol-2-phosphate (GP) with the cleavage of phosphoester bond induced by the Fe<sup>2+</sup>(Cu<sup>2+</sup>)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems has been studied. It has been shown that under the conditions of Cu<sup>2+</sup>-mediated generation of HO· β-Ala intensified the process, the greatest effect was observed at a molar ratio of amino acid : Cu<sup>2+</sup> > 10 : 1. α-Ala activated dephosphorylation of GP at the ratio of AA : Cu<sup>2+</sup> between 1.5 : 1 and 3 : 1, an increase in the ratio to 10 : 1 caused an inversion of the effect, and the level of phosphate anion decreased. In case of Fe<sup>2+</sup>-mediated fragmentation, alanines did not significantly affect the accumulation of the fragmentation product. At the same time effective HO·-scavengers, such as sodium azide and DMSO, inhibited fragmentation in a concentration-dependent manner. Taurine in the studied range of concentration had no significant effect on Cu<sup>2+</sup>(Fe<sup>2+</sup>)-mediated degradation of GP. Hypotaurine, on the contrary, had protective action, which was amplified with its concentration increase in the system.

**Ключевые слова:** таурин; гипотаурин; β-аланин; α-аланин; глицерофосфат; гидроксильный радикал; про/антиоксидант; реакция Фентона; ион Cu<sup>2+</sup>(Fe<sup>2+</sup>).

**Keywords:** taurine; hypotaurine; β-alanine; α-alanine; glycerophosphate; hydroxyl radical; pro/antioxidant; Fenton reaction; Cu<sup>2+</sup>(Fe<sup>2+</sup>) ion.

$\beta$ -Аминокислоты, таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) и  $\beta$ -аланин (3-аминопропановая кислота) играют важную роль в биологических процессах, хотя и не используются организмом в качестве строительных блоков молекул белков [1]. Таурин (Тау) в свободной форме является одной из наиболее распространенных аминокислот в мозге, сетчатке, мышцах и почти всех тканях млекопитающих, при этом полностью отсутствует в растениях [1, 2]. Тау выполняет широкий спектр функций в центральной нервной системе, оказывает кардиотропное действие, регулирует энергетические и репаративные процессы.  $\beta$ -Аланин ( $\beta$ -Ала) в свободном виде содержится в нервных тканях и служит нейромодулятором; в мышечных тканях является компонентом дипептидов карнозина и ансерина; входит в состав пантотеновой кислоты (витамин В5), необходимой для синтеза коэнзима А [1, 3].

В настоящее время исследуют механизмы вовлечения Тау и  $\beta$ -Ала в регулирование различных патологий и заболеваний, выясняют их цитопротекторный эффект. Одним из механизмов защитного действия  $\beta$ -аминокислот может быть их антиоксидантная активность [2, 4–6], направленная на коррекцию процессов, сопряженных с развитием окислительного стресса [7]. Последний характеризуется избыточным накоплением в клетках активных форм кислорода (АФК) ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$ ), среди которых радикал  $\text{HO}^\bullet$  наиболее токсичный. Ионы переходных металлов ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  и др.), имеющиеся в организме, способствуют образованию  $\text{HO}^\bullet$ , участвуя в реакциях с  $\text{H}_2\text{O}_2$  (реакции Фентона и Габера – Вейса) [7, 8]:



АФК способны индуцировать процессы повреждения важнейших биомолекул, в частности липидов биомембран, и, как следствие, нарушать функции клеток и организма в целом [7]. Одним из таких процессов может быть свободнорадикальная фрагментация глицерофосфолипидов. При взаимодействии последних с  $\text{HO}^\bullet$  в их полярной части образуются радикалы  $\text{R}_1\text{OCH}_2\text{C}^\bullet(\text{OH})\text{CH}_2\text{OR}_2$ , распадающиеся с разрывом фосфоэфирной связи и элиминированием молекулярного продукта – фосфатидной кислоты [9]. Роль аминокислот и их производных в регулировании свободнорадикальных процессов является предметом многочисленных исследований [10]. При этом их влияние на АФК-опосредованные процессы в гидрофильной части липидной мембраны практически не изучено.

В целом, несмотря на интенсивное изучение протекторных свойств Тау и  $\beta$ -Ала, детальный механизм их антиоксидантного действия остается не совсем ясным.

Цель работы – изучение влияния Тау и  $\beta$ -Ала на  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованную фрагментацию глицеро-2-фосфата с разрывом фосфоэфирной свя-

зи. Сравнивали действие  $\beta$ -аминокислот и протеиногенного  $\alpha$ -аланина, а также предшественника таурина в биосистеме – гипотаурина.

Фосфоэфиры глицерина (глицеро-1-фосфат, глицеро-2-фосфат) являются структурными фрагментами глицерофосфолипидов, поэтому могут быть использованы в качестве модельных соединений. Кроме того, они представляют собой важные компоненты клетки, участвующие не только в синтезе липидов, но и в некоторых метаболических процессах.

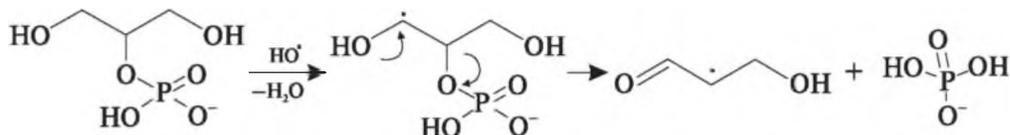


Рис. 1. Схема свободнорадикальной фрагментации глицеро-2-фосфата

При действии источников АФК на глицеро-2-фосфат (ГФ) разрыв фосфоэфирной связи в его молекуле происходит в основном за счет фрагментации первичных радикалов  $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}^-)-\text{C}\cdot\text{H}(\text{OH})$  или  $\text{HC}\cdot(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}^-)-\text{CH}_2(\text{OH})$  с элиминированием неорганического фосфата (рис. 1) [11, 12]. Основной вклад в инициирование процесса вносят радикалы  $\text{HO}\cdot$ , константа скорости их взаимодействия с глицеро-2-фосфатом составляет  $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  (рН 8,0) [13]. Свободнорадикальное дефосфорилирование ГФ протекает с высокой скоростью ( $k_v > 10^6 \text{ c}^{-1}$ ) [12].

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали таурин (изоэлектрическая точка, рI 5,16),  $\beta$ -аланин (рI 6,89),  $\alpha$ -аланин ( $\alpha$ -Ала) (рI 6,01), гипотаурин (гТау) (рI 5,98), терефталевую кислоту (1,4-бензолдикарбоновая кислота) от фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия). Азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), гидропероксид, диметилсульфоксид (ДМСО), соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  были получены от ЗАО «Вектон» (Россия).

Все использованные в работе реактивы и растворители имели аналитическую степень чистоты. Водные растворы готовили на деионизированной воде.

Химическое инициирование свободнорадикальных процессов осуществляли с помощью редокс-систем  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$ , генерирующих  $\text{HO}\cdot$ . К растворам ГФ добавляли  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , конечная концентрация которых указана в подписях к рисункам. Тестируемые вещества вводили в раствор субстрата до добавления компонентов редокс-систем. Образцы тщательно перемешивали после добавления каждого реагента и далее термостатировали при температуре 37 °С.

Свободнорадикальную фрагментацию ГФ оценивали по образованию молекулярного продукта – неорганического фосфата. Фосфат-анион в растворах

ГФ (рН 7,0) определяли фотокolorиметрически по модифицированной методике, изложенной в [14]. В основе анализа использована цветная реакция фосфат-аниона с молибдатом аммония. Процедура анализа была следующая: к 0,2 см<sup>3</sup> исследуемой пробы добавляли 1 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> раствора (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (1,8 % раствор в 1М растворе H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и 0,2 см<sup>3</sup> раствора FeSO<sub>4</sub> (10 % раствор в 0,075 М растворе H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Полученный раствор фотометрировали относительно холостой пробы при длине волны, равной 720 нм. Концентрацию фосфат-аниона как продукта свободнорадикальных превращений ГФ рассчитывали по калибровочной кривой. Для приготовления калибровочных растворов использовали однозамещенный фосфат калия марки о. с. ч., высушенный до постоянного веса при температуре 110 °С. Навески KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> растворяли в 25 мМ растворе глицерофосфата, диапазон концентраций растворов был 0–2 мМ.

Относительные константы скорости реакции ( $k_{S,HO\cdot}$ ) тестируемых соединений ( $S$ ) с радикалами HO<sup>•</sup> определяли, используя метод флуоресцентных зондов, как описано ранее в работе [15]. В качестве зонда использовали терефталевую кислоту.

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 исследовании влияния β-Ала в диапазоне концентраций 0,017–2,0 ммоль/дм<sup>3</sup> на дефосфорилирование ГФ в условиях Cu<sup>2+</sup>-опосредованного генерирования радикалов HO<sup>•</sup> выявлено, что аминокислота не обладает протекторной активностью в регулировании процесса (рис. 2, а). Повышение количества β-Ала в системе сопровождается активацией (~1,9 раза) фрагментации ГФ.

В отличие от β-Ала влияние протеиногенного α-Ала на Cu<sup>2+</sup>-опосредованную фрагментацию ГФ более сложное (рис. 2, б). При увеличении его концентрации и молярного соотношения α-Ала : Cu<sup>2+</sup> (от 1,5 : 1 до 3 : 1) деструкция ГФ усиливается в 1,5 раза. Дальнейшее повышение этого соотношения до 10 : 1 приводит к инверсии эффекта аминокислоты, уровень фосфат-аниона снижается в ~1,3 раза.

Сравнивали действие аланинов и азиды натрия, который в отличие от аминокислот ингибирует деструкцию ГФ (рис. 3, а). NaN<sub>3</sub> акцептирует HO<sup>•</sup> с высокой константой скорости ( $1,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [16]), превращаясь при этом в азидил-радикал (N<sub>3</sub><sup>•</sup>) – более слабый окислитель, чем HO<sup>•</sup> (редокс-потенциал  $E(\text{N}_3^*/\text{N}_3^-) = 1,33 \text{ В}$ ,  $E(\text{HO}^{\cdot}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}) = 2,73 \text{ В}$  [17]). Кроме того, радикалы N<sub>3</sub><sup>•</sup> быстро диспропорционируют ( $2k_y = 9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ). Реакции NaN<sub>3</sub> с O<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при нейтральном рН среды неэффективны ( $k_v < 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , рН 7,0) [16].

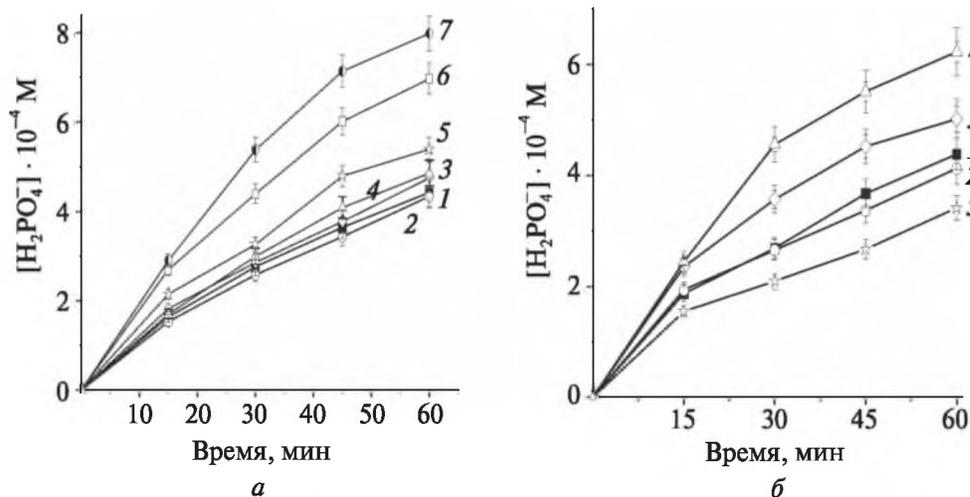


Рис. 2. Накопление  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  в 25 мМ растворе ГФ, инкубированном при 37 °С в присутствии  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (концентрация компонентов 0,05 и 15 ммоль/дм<sup>3</sup> соответственно), содержащем  $\beta$ -Ала (а) и  $\alpha$ -Ала (б): 1 – 0; 2 – 0,017; 3 – 0,083; 4 – 0,17; 5 – 0,5; 6 – 0,83; 7 – 2,0 ммоль/дм<sup>3</sup>

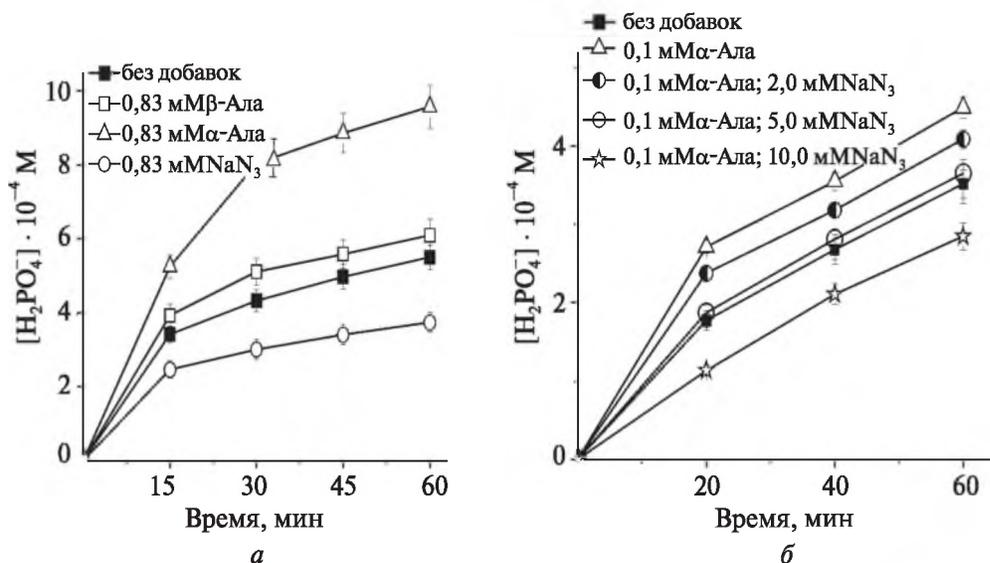


Рис. 3. Влияние добавок  $\beta$ -Ала,  $\alpha$ -Ала и  $\text{NaN}_3$  на накопление  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  в растворе глицero-2-фосфата, инкубированном при 37 °С в присутствии  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  при концентрациях компонентов:  $C(\text{ГФ})$  50;  $\text{CuSO}_4$  – 0,5;  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 10 ммоль/дм<sup>3</sup> (а) и  $C(\text{ГФ})$  25;  $\text{CuSO}_4$  – 0,05;  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 15 ммоль/дм<sup>3</sup> (б)

Прооксидантное действие  $\alpha$ -Ала на фрагментацию ГФ снижается в присутствии  $\text{NaN}_3$  с ростом его концентрации от 2 до 10 ммоль/дм<sup>3</sup> (рис. 3, б). Следует отметить, что радикалы  $\text{N}_3^*$  инертны по отношению к аланину [19].

Исходя из полученных данных (см. рис. 2, 3), следует, что влияние  $\beta$ -Ала и  $\alpha$ -Ала на фрагментацию ГФ сильно зависит от их молярного соотношения с  $\text{Cu}^{2+}$ , а не с ГФ.

Дефосфорилирование ГФ, индуцированное системой  $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии (0,05–1,0) mM раствора  $\beta$ -Ала, статистически значимо не отличается от контроля (рис. 4, а). При данных условиях аналогично поведение и  $\alpha$ -Ала. Отметим, что ДМСО в таком же концентрационном диапазоне оказывает протекторное действие, величина которого зависит от концентрации. Уровень  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  снижается в присутствии ДМСО в 1,4–1,5 раза (рис. 4, б). Известно [18], что ДМСО эффективно взаимодействует с  $\text{HO}^*$  ( $k_v = 6,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [13]) с образованием менее активного метильного радикала и метансульфиновой кислоты.

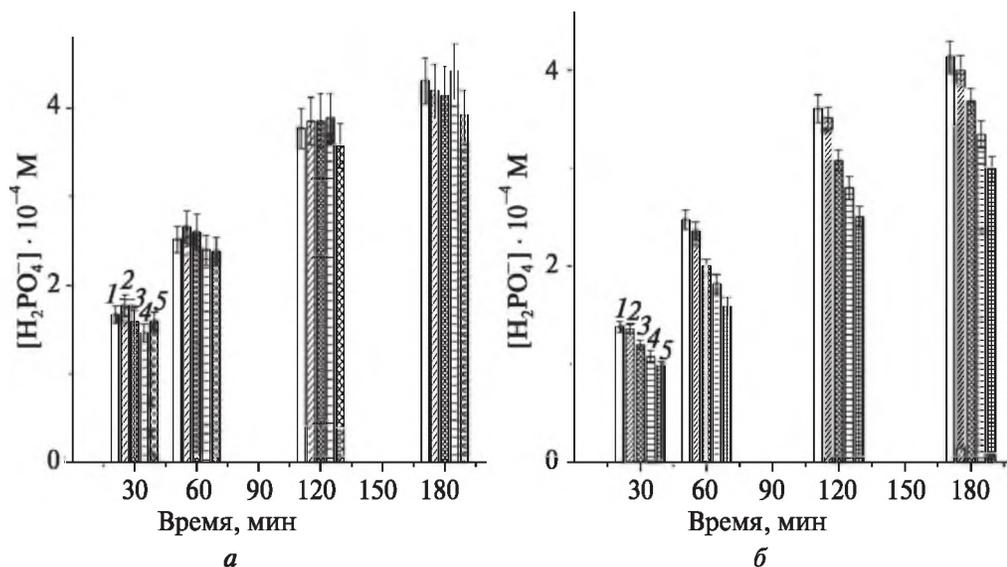


Рис. 4. Накопление  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  в 25 mM растворе ГФ, инкубированном при 37 °С и содержащем 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{FeSO}_4$  и 10 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также  $\beta$ -Ала (а) и ДМСО (б) при их концентрации: 1 – 0; 2 – 0,05; 3 – 0,1; 4 – 0,5; 5 – 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>

Аминокислоты могут различным образом влиять на дефосфорилирование ГФ, индуцированное  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -содержащими редокс-системами. С одной стороны, они, взаимодействуя с  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ , могут влиять на способность редокс-систем генерировать  $\text{HO}^*$ . С другой стороны, они акцептируют образующиеся радикалы  $\text{HO}^*$  и тем самым уменьшают их долю в реакциях с ГФ.

Прооксидантный эффект  $\beta$ -Ала и  $\alpha$ -Ала можно объяснить тем, что аминокислоты хелатируют ионы  $\text{Cu}^{2+}$  (координационное число 4 или 6), что способствует восстановлению ионов до  $\text{Cu}^+$  (координационное число 2 или 4) в реакции (1). Это, в свою очередь, содействует протеканию реакции (3) и повышению уровня  $\text{HO}^\bullet$ . Снижение активирующего действия  $\alpha$ -Ала в присутствии  $\text{NaN}_3$ , эффективного акцептора  $\text{HO}^\bullet$ , подтверждает такое предположение. Зависимость влияния аланинов от мольного соотношения Ала :  $\text{Cu}^{2+}$  указывает на то, что комплексы меди(II) с разным числом лигандов имеют различные каталитические свойства. Это согласуется с данными работы [20].

В присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ) может осуществляться «сайт-специфический» механизм свободнорадикального повреждения биомолекул [21]. В данном случае происходит формирование комплекса аминокислота– $\text{Cu}^{2+}$ –ГФ и радикалы  $\text{HO}^\bullet$  образуются в непосредственной близости к ГФ, что способствует их быстрому взаимодействию. При этом вероятность реакций  $\text{HO}^\bullet$  с другими присутствующими в растворе молекулами снижается. Возможно, таким снижением объясняется умеренный протекторный эффект азида натрия в высокой концентрации (см. рис. 3, б).

Развитие окислительного стресса и апоптоз наблюдали в митохондриях при введении избытка  $\beta$ -Ала [25]. Можно предположить, что механизм такого действия заключается в инициации свободнорадикальной фрагментации кардиолипина, важнейшего глицерофосфолипид митохондрий [9].

Различие во влиянии  $\beta$ -Ала и  $\alpha$ -Ала обусловлено отличием во взаимодействии с ионами меди.  $\alpha$ -Ала обладает высокой аффинностью к ионам  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  [22], большей (в  $\sim 3$  раза)  $\text{Cu}^{2+}$ -хелатирующей активности в низких концентрациях [23] и более высокой константой стабильности комплекса [24] по сравнению с  $\beta$ -Ала. Данные факты обуславливают, по-видимому, антиоксидантный эффект  $\alpha$ -Ала при повышении его концентрации в системе. Согласно данным [23]  $\alpha$ -Ала при увеличении его концентрации до 20–40 ммоль/дм<sup>3</sup> оказывает небольшой антиоксидантный эффект на автоокисление линолевой кислоты, а  $\beta$ -Ала не обладает таким действием.

Реакция взаимодействия  $\alpha$ -Ала с  $\text{HO}^\bullet$  имеет низкую константу скорости, равную  $7,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  (рН 5,5–6,8) [13]. Относительное значение  $k_{s,\text{HO}^\bullet}$ , рассчитанное для  $\beta$ -Ала в этой работе, составляет  $4,84 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , а для референтных  $\text{NaN}_3$  и ДМСО – соответственно  $9,3 \cdot 10^9$  и  $5,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , что хорошо согласуется с литературными данными, приведенными ранее. Величины констант указывают, что  $\alpha$ -Ала и  $\beta$ -Ала не являются эффективными  $\text{HO}^\bullet$ -акцепторами и в низких концентрациях не могут успешно конкурировать с ГФ во взаимодействии с гидроксильными радикалами.

Способность аланинов хелатировать  $\text{Fe}^{2+}$  (координационное число 6) гораздо ниже, чем в случае  $\text{Cu}^{2+}$ . Значения констант стабильности комплексов ( $\log K$ )  $\beta$ -Ала и  $\alpha$ -Ала с ионами  $\text{Fe}^{2+}$  составляют соответственно 4,0 и 7,3, а для  $\text{Cu}^{2+}$  – 12,9 и 15,1 [24, 26].

Приведенные выше факты в совокупности объясняют отсутствие антиоксидантного влияния аланинов на  $\text{Fe}^{2+}$ -опосредованное дефосфорилирование ГФ. Это согласуется с отсутствием протекторного действия  $\beta$ -Ала на окисление ДНК, индуцированное системой  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{-H}_2\text{O}_2$ -аскорбат [27].

На рис. 5 представлены данные, полученные при изучении влияния Тау на фрагментацию ГФ, индуцированную  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -содержащими редокс-системами. Аминокислота в исследованном диапазоне концентраций 0,5–2,0 ммоль/дм<sup>3</sup> не обнаруживает статистически значимого эффекта в обеих системах.

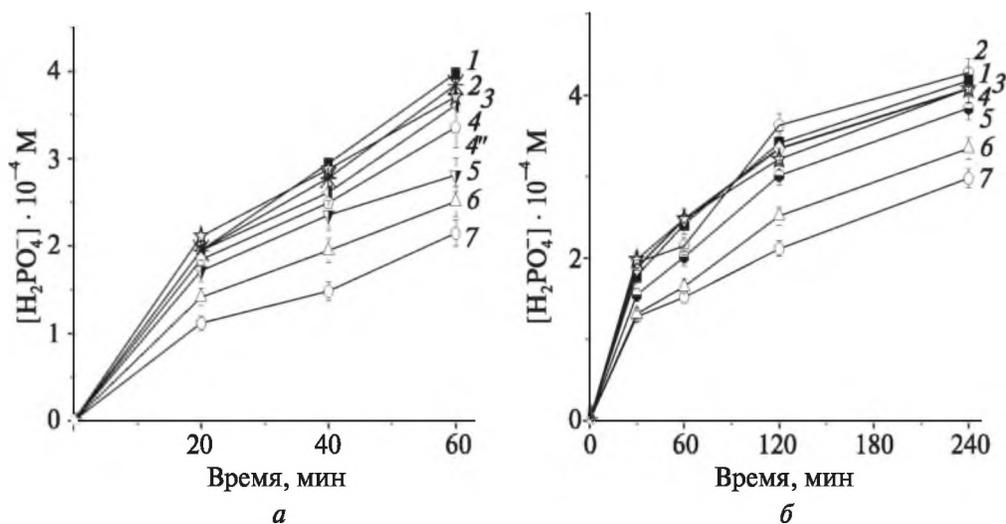


Рис. 5. Накопление  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  в растворе глицеро-2-фосфата при его концентрации 25 ммоль/дм<sup>3</sup> (а) и 50 ммоль/дм<sup>3</sup> (б), инкубированном при 37 °С в присутствии 0,05 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{CuSO}_4$  и 15 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а); 0,05 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{FeSO}_4$  и 10 ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  (б), содержащем Тау (2–4) и  $\gamma$ Тау (4'–7) при их концентрации 0 (1); 0,1 (4'); 0,5 (2, 5), 1,0 (3, 6), 2,0 (4, 7) ммоль/дм<sup>3</sup>

Это можно объяснить тем, что, с одной стороны, Тау не способен эффективно хелатировать ионы  $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ , его комплексы с  $\text{Fe}^{2+}$  не стабильны, а значение  $\log K$  для комплекса с  $\text{Cu}^{2+}$  невысокое (8,0) [24]. С другой стороны, сульфокислота Тау проявляет слабую способность акцептировать радикалы  $\text{HO}^\bullet$  ( $k_{S,\text{OH}} = 1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [15]), не реагирует с гидропероксидом и супероксид-радикалом [28]. Эти сведения находятся в корреляции с данными [29] о том, что Тау не ингибирует свободнорадикальное пероксидное окисление липидов. Некоторую активность в отношении пероксильных радикалов и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  Тау обнаруживает только в очень высоких концентрациях ( $>0,05$  ммоль/дм<sup>3</sup>) [4].

Главным интермедиатом в синтезе Тау является гипотаурин (1-аминоэтан-2-сульфиновая кислота). В высоких концентрациях он содержится в репродуктивных тканях и жидкостях. В отличие от сульфокислоты гТау оказывает антиоксидантное действие на  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ )-опосредованную деструкцию ГФ с разрывом фосфоэфирной связи (см. рис. 5). Защитное действие гТау может проявлять на стадии инициирования процесса посредством акцептирования  $\text{HO}^{\bullet}$ , так как это взаимодействие протекает с высокой константой скорости, равной  $1,15 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [28].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние таурина, гипотаурина,  $\beta$ -аланина и  $\alpha$ -аланина на свободнорадикальную фрагментацию глицерофосфата в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Установлено, что  $\beta$ -аминокислоты различным образом регулируют  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ -опосредованный процесс. В присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  действие Тау и  $\beta$ -Ала не отличается значимым образом от контроля, протеиногенный  $\alpha$ -Ала также не обнаруживает существенного про(анти)оксидантного эффекта.

В условиях  $\text{Cu}^{2+}$ -опосредованного генерирования радикалов  $\text{HO}^{\bullet}$  Тау также не влияет на дефосфорилирование глицерофосфата. При молярном соотношении аминокислота :  $\text{Cu}^{2+} > 10$   $\beta$ -Ала начинает значительно интенсифицировать процесс, а в случае  $\alpha$ -Ала происходит инверсия эффекта с прооксидантного на протекторный. Снижение активирующего действия аланинов в присутствии  $\text{NaN}_3$  указывает на то, что они усиливают способность  $\text{Cu}^{2+}$ -содержащей редокс-системы генерировать  $\text{HO}^{\bullet}$  и тем самым интенсифицируют дефосфорилирование глицерофосфата на стадии инициирования.

Гипотаурин оказывает антиоксидантное влияние на  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ )-опосредованную деструкцию глицерофосфата в концентрационно-зависимой манере.

Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия аминокислот в регулировании свободнорадикальных процессов в клетке.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition // *Amino Acids*. 2009. Vol. 37. P. 1–17.
2. Schaffer S., Kim H. W. Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent // *Biomol. Ther.* 2018. Vol. 26, № 3. P. 225–241.
3. Tiedje K. E., Stevens K., Barnes S., Weaver D. F.  $\beta$ -Alanine as a small molecule neurotransmitter // *Neurochem. Int.* 2010. Vol. 57, № 3. P. 177–188.
4. Oliveira M. W. S., Minotto J. B., de Oliveira M. R. [et al.]. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species // *Pharmacol. Rep.* 2010. Vol. 62. P. 185–193.

5. *Jong C. J., Azuma J., Schaffer S.* Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production // *Amino Acids*. 2012. Vol. 42, № 6. P. 2223–2232.
6. *Smith A. E., Stout J. R., Kendall K. L.* [et al.]. Exercise-induced oxidative stress: the effects of  $\beta$ -alanine supplementation in women // *Amino Acids*. 2011. Vol. 43, № 1. P. 77–90.
7. *Halliwell B., Gutteridge J. M. C.* Free radicals in biology and medicine, fourth edition. Oxford : University press, 2012.
8. *Valko M., Jomova K., Rhodes C. J.* [et al.]. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease // *Arch. Toxicol.* 2016. Vol. 90. P. 1.
9. *Юркова И. Л.* Свободнорадикальные реакции глицеро- и сфинголипидов // *Успехи химии*. 2012. Т. 81, № 2. С. 175–190.
10. *Stadtman E. R., Levine R. L.* Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // *Amino Acids*. 2003. Vol. 25. P. 207–218.
11. *Schuchmann M. N., Scholes M. L., Zegota H., von Sonntag C.* Reaction of hydroxyl radicals with alkyl phosphates and the oxidation of phosphatoalkyl radicals by nitro compounds // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. Vol. 68, № 2. P. 121–131.
12. *Кисель М. А., Шадыро О. И., Юркова И. Л.* Радиационно-иницированная свободнорадикальная фрагментация биологически активных глицеридов // *Химия высоких энергий*. 1997. Т. 31, № 2. С. 99–103.
13. *Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P., Ross A. B.* 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.
14. *Gin F. J., Morales F.* Application of one-step procedure of measurement of inorganic phosphate in the presence of proteins actomyosin ATPase System // *Anal. Biochem.* 1977. Vol. 77, № 1. P. 10–18.
15. *Милач О. А., Козыревская А. Л., Юркова И. Л.* Изучение про/антиоксидантных свойств биологически активных соединений в присутствии ионов  $\text{Cu}(\text{II})$  методом флуоресцентных зондов // *Свиридовские чтения : сб. ст. Минск, 2018. Вып. 14. С. 117–128.*
16. *Betterton E. A.* Environmental fate of sodium azide derived from automobile airbags // *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 2003. Vol. 33. P. 423–458.
17. *Wardman P.* Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution // *J. Phys. Chem. Reference Data*. 1989. Vol. 18, № 4. P. 1637–1755.
18. *Yurkova I. L., Schuchmann H.-P., von Sonntag C.* Production of OH radicals in the autoxidation of the  $\text{Fe}(\text{II})$ -EDTA system // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. 1999. Vol. 10. P. 2049–2052.
19. *Land E. J., Prutz W. A.* Reaction of azide radicals with amino acids and proteins // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 1979. Vol. 36. P. 75–83.
20. *Lin T., Wu C.* Activation of hydrogen peroxide in copper(II)/amino acid/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems: effects of pH and copper speciation // *J. Catalysis*. 2005. Vol. 232, № 1. P. 117–126.
21. *Stadtman E. R., Levine R. L.* Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // *Amino Acids*. 2003. Vol. 25, № 3–4. P. 207–218.
22. *Senapati U., Mandal B., Bankura K. P.* The ground state  $\text{Cu}^{2+}$  ion affinities of glycine, alanine and cysteine in gas and aqueous phase: a DFT based computational study // *Rasayan J. Chem.* 2017. Vol. 10, № 3. P. 981–989.
23. *Wu H.-C., Shiau C.-Y., Chen H.-M., Chiou T.-K.* Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination // *J. Food Drug Anal.* 2003. Vol. 11, № 2. P. 148–153.

24. *Wright C. E., Tallan H. H., Lin Y. Y., Gaull G. E.* Turine: biological update // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 427–453.

25. *Shetewy A., Shimada-Takaura K., Warner D.* [et al.]. Mitochondrial defects associated with  $\beta$ -alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia // *Mol. Cell. Biochem.* 2016. Vol. 416, № 1–2. P. 11–22.

26. *Guida A., Zăgrean-Tuza C., Moș A. C., Sărbu C.* Comprehensive evaluation of radical scavenging, reducing power and chelating capacity of free proteinogenic amino acids using spectroscopic assays and multivariate exploratory techniques // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. 233, 118158. Doi: 10.1016/j.saa.2020.118158.

27. *Mozdzan M., Szemraj J., Rysz J., Nowak D.* Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 96. P. 352–360.

28. *Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B. M., Butler J.* The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem. J.* 1988. Vol. 256. P. 251–255.

29. *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.

Поступила в редакцию 20.05.2020