



УДК 546.23:54.057:577.112.3

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО 3,3'-ДИМЕТИЛПРОИЗВОДНОГО *L*-СЕЛЕНОЦИСТИНА

© 2019 г. П. А. Полубояринов^{*,#}, Н. А. Голубкина^{**}, А. А. Аниськов^{***}, И. Я. Моисеева^{****},
Н. Н. Глебова^{*****}, В. И. Швец^{*****}

^{*}ФГБОУ ВО “Пензенский государственный университет архитектуры и строительства”,
Россия, 440028, Пенза, ул. Германа Титова, 28

^{**}ФГБНУ “Федеральный научный центр овощеводства”, Саратов, Россия

^{***}ФГБОУ ВО “Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского”, Саратов, Россия

^{****}ФГБОУ ВО “Пензенский государственный университет”, Пенза, Россия,

^{*****}Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова), Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.12.2018 г.

После доработки 29.01.2019 г.

Принята к публикации 22.02.2019 г.

С использованием известной методики получения из β-хлораланина *L*-селеноцистина (3,3'-диселено-бис(2-аминопропионовая кислота)), имеющего свойство аккумулировать селен в организме и являющегося структурным аналогом природных серосодержащих аминокислот, из α-амино-β-хлормасляной кислоты, была синтезирована новая селенсодержащая аминокислота – 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин, $\overline{\text{Sec}} \text{Sec}$. Показано, что селен из 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина, также как и из природной аминокислоты – *L*-селеноцистина аккумулируется в тканях печени, мышцах и сыворотке крови крыс и его концентрация превышает контроль на 40.6, 14.0, 23.0% соответственно, а близкая степень накопления селена в тканях говорит о сходном пути метаболизма аминокислот и биологической доступности микроэлемента из новой аминокислоты. *L*-Селеноцистин и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин при введении крысам уменьшают концентрацию свободных аминокислот в их сыворотке крови на 12.2 и 11.8% соответственно, особенно концентрацию маркера стресса организма – пролина, на 74.6 и 66.4% соответственно.

Ключевые слова: *L*-селеноцистин, 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин, селен, сыворотка крови, аминокислоты, пролин

DOI: 10.1134/S0132342319040080

ВВЕДЕНИЕ

Являясь природным аналогом серы, селен активно замещает ее в природных соединениях, обуславливая существование значительного количества биологически активных белков, содержащих селеноцистеин [1]. Высокая биологическая активность органических форм селена, их уникальная антиоксидантная активность, способность защищать организм человека от онкологических, сердечно-сосудистых и нейрогенных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), определяют важность разработки эффективных методов синтеза селенсодержащих аминокислот и их производных, а также пептидов на их основе [2].

Селеноцистеин ((2*R*)-2-амино-3-селанилпропановая кислота, (Sec)) (I) – 21-ая протеиногенная аминокислота, которую на матричной РНК кодирует терминирующий кодон UGA при условии, что за ним следует особая стимулирующая последовательность нуклеотидов [3]. Окисленной формой селеноцистеина, устойчивой в хранении, удобной в получении и применении, является аминокислота селеноцистин ($\overline{\text{Sec}} \text{Sec}$). Селеноцистин содержится в различных растениях [4, 5] и является неотъемлемым компонентом органов и тканей животных [6].

Селеноцистин демонстрирует мощный защитный эффект от γ-излучения, предотвращая повреждение ДНК [7], обладает антигемолитической и антирадикальной активностью [8]. Особый интерес представляет противоопухолевая

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (950) 230-48-76; эл. почта: poluboyarinovpavel@yandex.ru).

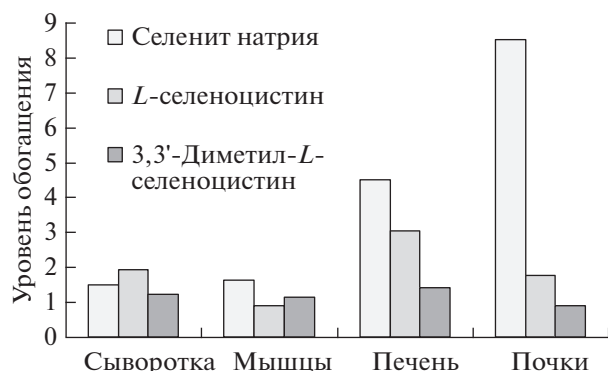


Рис. 1. Уровни обогащения органов и тканей селеном при использовании разных химических форм элемента.

активность селеноцистина. Было доказано, что это соединение ингибирует пролиферацию клеток MCF7 в аденокарциноме молочной железы человека путем индукции остановки клеточного цикла и апоптоза [9] и вызывает апоптоз клеток меланомы человека A375 [10]. Показано, что селеноцистин эффективен для обогащения растений селеном [11], в пчеловодстве (для повышения выхода маток пчел) [12], птицеводстве (для производства перепелиных яиц и мяса с повышенным содержанием селена) [13, 14].

Учитывая высокую антиканцерогенную активность известных метилированных производных селеноцистеина — *L*-метилселеноцистеина (MSC) и γ -глутамил-Se-метилселеноцистеина (GGMSC) [15–17], представляет интерес получение соответствующих производных селеноцистеина. Высокая биологическая активность метилированных форм серосодержащих аминокислот также известна. Так, метилантионин (II) — нестандартная серосодержащая аминокислота, является компонентом пептидных антибиотиков

субтилина [18, 19] и низина [20], а также присутствует в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*) [21]. Эта же аминокислота обнаружена в составе пептидного ингибитора ангиотензинпревращающего фермента — анковенина.

Фрагментом метилантионина является остаток *трео*-3-метил-*D*-цистеина ((2*S*,3*S*)-2-амино-3-меркаптобутановая кислота) (III), окисленной формой которого 3,3'-диметил-*D*-цистин (IV) [22]. Данные серосодержащие аминокислоты были синтезированы из треонина [23]. Селенсодержащий аналог соединения (IV), до наших исследований, был неизвестен науке.

Целью настоящего исследования был синтез *L*-селеноцистеина (V) и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистеина (3,3'-диселено-бис(2-аминобутановая к-та) (VI), из доступных *L*-аминокислот: серина и треонина. Важным аспектом является изучение биологической активности новой аминокислоты, как источника биодоступного селена и ее влияния на концентрацию свободных протеиногенных аминокислот и особенно маркера стресса — пролина, в сыворотке крови лабораторных крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез селенсодержащих аминокислот

Синтез 3,3'-диметил-*L*-селеноцистеина (VI) проводили по аналогии с известным методом синтеза *L*-селеноцистеина [24], характеризующимся сравнительной простотой и высоким выходом продукта.

Исходным веществом синтеза *L*-селеноцистеина был *L*-серин (VII). Из него, согласно работе [25], синтезировали β -хлор-*L*-аланин (VIII), его вводили в реакцию с диселенидом натрия (схема 1), который получали восстановлением элементарного селена боргидридом натрия [24].

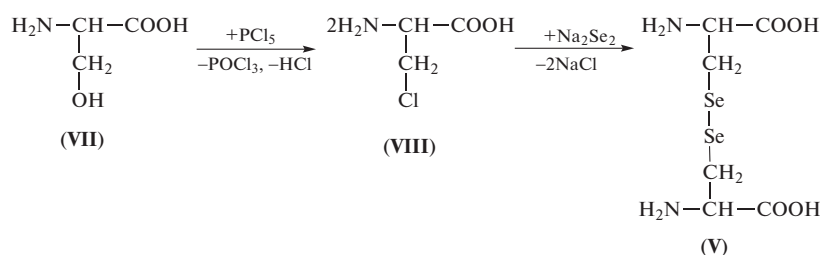


Схема 1. Метод синтеза *L*-селеноцистеина (V).

Для синтеза 3,3'-диметил-*L*-селеноцистеина (VI) в качестве исходного соединения использовали *L*-треонин (IX), из которого по методике работы [25] синтезировали α -амино- β -хлормасля-

ную кислоту (X). Посредством реакции между α -амино- β -хлормасляной кислотой с диселенидом натрия (при pH = 9) получали 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин (VI) (схема 2).

Таблица 1. Физико-химические характеристики 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина и *L*-селеноцистина

Показатель	3,3'-Диметил- <i>L</i> -селеноцистин $M_r (C_8H_{16}N_2Se_2O_4) = 362.15$ г/моль	<i>L</i> -селеноцистин $M_r (C_6H_{12}N_2Se_2O_4) = 334.09$ г/моль	Литературные данные для <i>L</i> -селеноцистина
Выход, %	≥50	≥60	60 [24]
Угол вращения плоскости поляризации 1% раствора в 1 N NaOH	-103° ± 3°	-28° ± 2°	-28° ± 2°**
Хроматографическая подвижность: R_f Сорбфил (изопропиловый спирт–25% аммиак, 7 : 3)	0.36	0.25	—
Время выхода при электрофорезе, мин	12.52 ± 0.30 $t_{ЭОП} = 7.12 ± 0.15^{***}$	16.77 ± 0.30 $t_{ЭОП} = 7.51 ± 0.15^{***}$	—
C, %	25.97 (26.53)*	22.30 (21.58)	20.30–22.70** 21.19 [24]
H, %	4.63 (4.45)	3.61 (3.59)	3.70 [24]
N, %	7.32 (7.74)	8.64 (8.38)	7.90–8.80** 8.37 [24]
Спектр ¹ H-ЯМР (δ, м.д.)	CH ₃ 1.31 (3H, д., <i>J</i> 8 Гц, CH), 3.58–3.64 (1H м, CH (CH-NH ₃ ⁺)), 4.06 (1H, д, <i>J</i> 7.25 Гц)	3.18 (2H дд, <i>J</i> 14 и 8 Гц, CH ₂), 3.32 (дд, <i>J</i> 14 и 5 Гц, CH-группы), 4.18 (1H, д.д., <i>J</i> 8 и 5 Гц)	
Спектр ¹³ C-ЯМР	18.2 (CH ₃), 37.6 (CH), 57.7 (CH), 170.1 (COOH)	26.6 (CH ₂), 52.9 (CH), 170.5 (COOH)	

* В скобках приведены расчетные значения.

** Данные фирмы “Sigma-Aldrich”.

*** Время выхода пика электроосмотического потока в минутах.

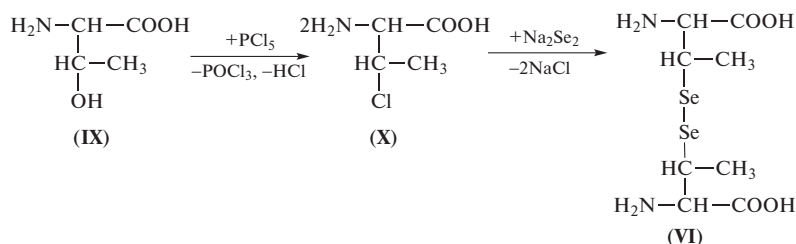


Схема 2. Синтез 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина (VI).

В отличие от *L*-селеноцистина, осаждение которого из реакционной среды достигалось изменением рН от 2 до 6.2, 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин оказался гораздо лучше растворим в воде. Для его выделения рН раствора доводили до рН 2 соляной кислотой, полученный раствор пропускали через хроматографическую колонку с катионитом КУ-2-8 в Н⁺-форме, и конечный продукт элюировали раствором аммиака. Структуры 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина (VI) и *L*-селеноцистина (V) были подтверждены элементным анализом и с помощью ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и хроматографии (табл. 1).

Данные ТСХ показали отсутствие примесей для *L*-селеноцистина ($R_f = 0.25$, изопропиловый спирт–25% раствор аммиака (7 : 3), ТСХ 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина ($R_f = 0.36$) также показал наличие лишь одного пятна.

Подвижность фенилтиокарбамоильных производных (FTC-производные) синтезированных *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина при капиллярном электрофорезе была разной: 16.77 ± 0.30 и 12.52 ± 0.30 мин соответственно.

Раствор 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина в 1 M NaOH характеризуется значительно большим углом поворота плоскости поляризации, чем рас-

Таблица 2. Аккумуляция селена (мкг/кг) органами и тканями крыс при его введении в разных формах

Ткань/орган	Контроль	Селенит натрия	<i>L</i> -Селеноцистин	3,3'-Диметил- <i>L</i> -селеноцистин
Сыворотка крови, мкг/л	235 ± 20	353 ± 20	453 ± 12	289 ± 12
Мышцы	270 ± 11a*	438 ± 24a	242 ± 10a	308 ± 20a
Печень	475 ± 25b	2143 ± 113b	1444 ± 86b	668 ± 40b
Почки	754 ± 26c	6416 ± 131c	1322 ± 115b	670 ± 29b

* Значения в столбцах с одинаковыми индексами статистически не различаются при $P > 0.05$.

твор *L*-селеноцистина: $[\alpha]_D^{20} = -103^\circ \pm 3^\circ$, и $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ \pm 2^\circ$ соответственно. Следует отметить, что серосодержащая аминокислота – *L*-цистин, также характеризуется большим углом поворота плоскости поляризации, особенно вблизи изоэлектрической точки, что связано с образованием хелатной эндоциклической структуры [26].

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР подтверждают структуру синтезированных аминокислот. Из-за дейтерообмена сигналы амино- и карбоксильных групп в ^1H -ЯМР синтезированных соединений были неразличимы.

Аккумуляция селена органами и тканями крыс

Биологическая доступность селена из органических соединений является одной из важнейших характеристик и определяется по степени аккумуляции микроэлемента органами, тканями и в сыворотке крови лабораторных животных. Особый интерес в этом отношении представляет аминокислота 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин как новый источник микроэлемента селена (табл. 2).

Как следует из данных табл. 2, содержание селена у крыс, получавших селенит натрия, убывало в ряду: почки > печень > мышечная ткань, в то время как для *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина уровни накопления селена в печени и почках статистически не различались.

Сравнение уровней обогащения селеном органов и тканей крыс при использовании разных химических форм элемента (рис. 1) показывает принципиальные различия усвоения органических форм селена и селенита натрия. Так, наибольшее увеличение уровня селена в сыворотке крови наблюдалось при использовании *L*-селеноцистина (в 1.9 раз). Меньшую степень накопления селена сывороткой крови давал селенит натрия (1.4 раза), в то время как 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин обеспечивал возрастание уровня селена в сыворотке крови всего в 1.2 раза. Уровень обогащения селеном мышечной ткани убы-

вал в ряду: селенит натрия > 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин > *L*-селеноцистин.

Особенно мощные различия в обогащении селеном при использовании различных производных микроэлемента наблюдались для печени и почек. Наибольшие уровни обогащения оказались характерны для неорганической формы селена, составившие 4.51 и 8.51 раз соответственно. В отличие от селенита натрия *L*-селеноцистин способствовал более интенсивному накоплению селена печенью, чем почками (3.04 раза по сравнению с 1.75 раз). Та же закономерность наблюдалась для 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина, однако эта метилированная форма достоверно не влияла на содержание селена в почках и увеличивала содержание микроэлемента в печени в 1.41 раз.

Выявленные закономерности накопления селена в печени и сыворотке крови говорят о возможности близких путей метаболизма *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина. Известно, что после перорального введения животным, *L*-селеноцистин взаимодействует с восстановленным глутатионом с образованием Se,S-селеноцистеинглутатион (Sec-SG). Отмечается, что данная реакция проходит в тонком кишечнике [27, 28].

На втором этапе, Sec-SG не ферментативно восстанавливается до *L*-селеноцистеина избытком глутатиона в печени. И только на третьем этапе, *L*-селеноцистеин расщепляется селеноцистеин-β-лиазой (КФ 4.4.1.16), до селеноводорода (H_2Se) и аланина [29].

Можно предположить, что 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин также восстанавливается до 3-метилселеноцистеина (XI) восстановленным глутатионом, а затем расщепляется ферментом селеноцистеин-β-лиазой до селеноводорода и α-аминомасляной кислоты (ААВА, бутирин (XII)) – предшественника синтеза офтальмовой кислоты, являющейся аналогом глутатиона в хрусталике глаза.

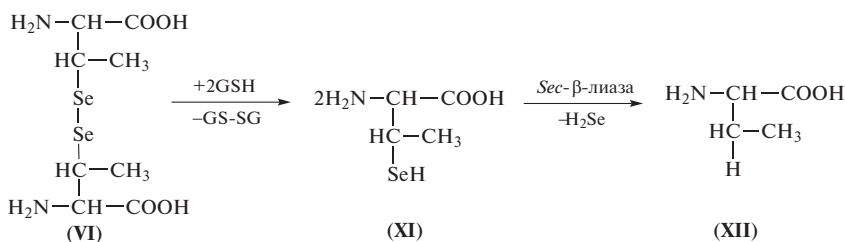


Схема 3. Возможный путь метаболизма 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина.

Таким образом, если предложенный механизм метаболизма аминокислоты подтвердится в дальнейших исследованиях, то 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин, как и *L*-селеноцистин будет физиологически совместимым источником микроэлемента селена.

Влияние на аминокислотный профиль сыворотки крови

Известно, что большинство аминокислот при их введении в организм в более высоких дозах, чем они поступают с пищей, оказывает фармакологическое действие [30]. Во многом это обусловлено регуляторными функциями, которыми наделены многие из свободных аминокислот, а в нашем исследовании регуляторными функциями обладает, по-видимому, еще и микроэлемент селен.

Влияние селенита натрия и селенсодержащих аминокислот на свободные аминокислоты сыворотки крови лабораторных крыс представлены в табл. 2.

Исследование аминокислотного профиля сыворотки крови при воздействии различных химических форм селена показывает (табл. 3), что все химические производные селена достоверно снижают уровень серина (в 1.8–2.2 раза). Содержание глутаминовой кислоты и глутамина снижается под действием селенита натрия и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина в 3.2–3.4 раза, в то время как селеноцистин достоверно не изменяет уровень этих аминокислот.

В присутствии селенсодержащих соединений, происходит снижение уровня свободных аминокислот в сыворотке крови на 10.7–12.2%, и это явление характерно для всех исследованных форм селена.

В ряде исследований показано, что воздействие теплового стресса, экспериментального гипотиреоза [31] и индуцированного аллоксаном диабета [32], сопровождается возрастанием концентрации свободных аминокислот в сыворотке крови крыс. Вероятно, что одним из механизмов стрессорного повреждения органов и тканей является преобладание процессов гидролиза белков над скоростью их ресинтеза.

В нашем исследовании основным стрессовым фактором является рацион контрольного варианта опыта без добавления селена. Введение в организм крыс *per os* селена (2.44 мг Se/кг) в виде селенита натрия и селенсодержащих аминокислот приводит к снижению воздействия стрессирующего фактора, что выражается в уменьшении содержания свободных аминокислот в сыворотке крови.

Анализ содержания индивидуальных аминокислот в сыворотке крови показал, что использование селенита натрия, *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина в качестве источника селена, приводит к разнонаправленному изменению их концентрации. **Увеличились** концентрации: гистидина соответственно на 21.3, 23.6, 10.2%; валина – на 58.5, 64.1 18.0%; треонина – на 8.4, 3.5, 14.8%, **уменьшились** концентрации аргинина на 12.2, 55.4, 23.6%; фенилаланина – на 13.5, 13.5, 17.5%; пролина – на 31.3, 74.6, 66.4%; серина – на 47.8, 55.5, 44.6%. Интересно, что уровень метионина в сыворотке крови не изменяется под действием селенита натрия и достоверно возрастает при действии органических форм селена, причем этот эффект выражен максимально при использовании 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина.

Одним из маркеров стресса является концентрация пролина, так как это единственная протеиногенная аминокислота, которая метаболизируется собственной группой ферментов, реагирующих на метаболический стресс и участвующих в метаболической сигнализации [33].

Концентрация пролина в варианте с селенитом натрия ниже контроля на 31.3%. Более активны селеноаминокислоты: снижение концентрации пролина в варианте с *L*-селеноцистином составляет 74.6%, а в варианте с 3,3'-диметил-*L*-селеноцистином – 66.4%, что говорит об их близком механизме метаболизма.

В целом, все селенсодержащие препараты снижают общую концентрацию аминокислот в сыворотке крови и маркера стресса – аминокислоты пролина, но более активны в этом отношении *L*-селеноцистин и новая селенсодержащая аминокислота 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин.

Таблица 3. Содержание аминокислот (мкмоль/л) в сыворотке крови лабораторных крыс при введении им *per os* селенита натрия и селенсодержащих аминокислот в дозе 2.44 мг Se/кг

Аминокислота	Концентрация аминокислот, мкМ			
	контроль	селенит натрия	<i>L</i> -селеноцистин	3,3'-диметил- <i>L</i> -селеноцистин
Аргинин*	37.89 ± 1.52a	33.24 ± 1.33b	28.99 ± 1.16c	21.01 ± 0.84d
Лизин*	47.20 ± 1.61a	68.81 ± 2.34b	35.98 ± 1.22c	47.13 ± 1.60a
Тирозин	31.57 ± 0.95ab	22.63 ± 0.68c	30.63 ± 0.92a	32.12 ± 0.96b
Фенилаланин*	11.50 ± 0.35a	10.17 ± 0.31b	9.50 ± 0.28b	9.99 ± 0.30b
Гистидин*	15.79 ± 0.79a	19.21 ± 0.96bc	17.40 ± 0.87b	19.53 ± 0.98c
Лейцин+*	23.25 ± 0.60a	21.65 ± 0.56a	22.56 ± 0.59a	34.69 ± 0.90b
Изолейцин				
Метионин*	29.76 ± 1.01a	29.02 ± 0.99a	32.84 ± 1.12b	39.54 ± 1.34c
Валин*	15.71 ± 0.63a	24.93 ± 1.00b	18.52 ± 0.74c	25.78 ± 1.03b
Пролин	77.30 ± 2.01a	53.07 ± 1.38b	51.33 ± 1.34b	57.67 ± 1.50c
Треонин*	104.10 ± 4.16a	115.01 ± 4.60b	119.70 ± 4.79b	107.96 ± 4.32a
Серин	122.47 ± 3.18a	59.66 ± 1.55b	54.62 ± 1.42c	68.04 ± 1.77d
Аланин	60.05 ± 1.56a	70.83 ± 1.84b	57.02 ± 1.48a	56.68 ± 1.42c
Глицин	4.0 ± 0.14	—**	—**	—**
Глутаминовая кислота и глутамин	24.74 ± 0.99a	7.27 ± 0.29b	40.10 ± 1.60c	7.81 ± 2.0b
∑ аминокислот	605.33 ± 19.49a	535.50 ± 17.83b	519.19 ± 17.53b	527.95 ± 17.16b

Значения содержания для аминокислот в столбцах с одинаковыми индексами (a–d) статистически не различаются, $P > 0.05$. * – незаменимые для организма крыс аминокислоты; ** – следы.

Выводы

Таким образом, на основе известной методики синтеза *L*-селеноцистина была синтезирована новая селенсодержащая аминокислота – 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин (VI), являющаяся структурным аналогом природных серосодержащих аминокислот. Селен из 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина, также как и из *L*-селеноцистина, биологически доступен и аккумулируется в тканях и сыворотке крови крыс. Обе аминокислоты уменьшают концентрацию свободных аминокислот в сыворотке крови крыс и особенно маркер стресса организма – аминокислоту пролин. По результатам исследования был получен патент [34].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографические тесты проводили на пластине “Sorbfil” (фирма “ИМИД”) методом восходящей ТСХ. После элюирования в системе растворителей изопропиловый спирт–25% аммиак (7 : 3) и высушивания пластины пятна *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина обнаруживали опрыскиванием 0.5% раствором нингидрина в изопропиловом спирте.

Анализ чистоты *L*-селеноцистина и 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина проводили методом капил-

лярного электрофореза на приборе “Капель 105М” фирмы “Люмекс” (Россия) в виде фенилтиокарбамоильных производных. Пробоподготовка и анализ проводится по методике [35].

Также проводился анализ образцов аминокислот без дериватизации в боратном буфере по собственному поглощению аминогрупп (детектирование при длине волны 190 нм).

Элементный анализ выполняли на приборе “Vario El cube” (Elementar Analysensysteme, Германия).

Углы вращения измеряли на поляриметре СМ-3 (Россия).

Синтез *L*-селеноцистина ((*R,R*)-3,3'-диселенобис(2-аминопропионовая кислота), осуществлен согласно модифицированной методике [24].

1 М раствор диселенида натрия (Na_2Se_2) получали добавлением элементарного селена (4.5 г, 56 ммоль) к 10 мл 1 М раствора NaOH и 15 мл дистиллированной воды в закрытой трехгорлой колбе с магнитной мешалкой. Раствор 4.5 г (119 ммоль) боргидрида натрия в воде (25 мл) добавляли по каплям к суспензии элементарного селена до момента, когда раствор становится бесцветным. Дополнительное количество элементарного селена (4.5 г, 56 ммоль) добавляется к этому раствору (раствор становится красновато-

коричневым, цвет который характерен для диселенида натрия). Раствор 5 г (31 ммоль) β-хлор-*L*-аланина (VIII) доводили до pH 9 добавлением 1 М раствора гидроксида натрия и в течение 30 мин добавляли в раствор диселенида натрия, находящийся в трехгорлой колбе, и перемешивали в течение 12–16 ч при температуре 37°C. Добавляли в полученный раствор по каплям 6 М HCl до pH 2. Для удаления следов селеноводорода раствор барботировали воздухом в течение 2–3 ч. Раствор фильтровали для удаления осадка элементарного селена и доводили 10 М раствором гидроксида натрия до pH 6–6.5. Раствор охлаждали до 5°C, с выходом желтых кристаллов *L*-селеноцистина не менее 60% чистотой не менее 97% (ТСХ).

3,3'-Диметил-*L*-селеноцистин ((2*R*)-3,3'-диселено-бис(2-аминомасляная кислота). 1 М раствор диселенида натрия (Na₂Se₂) получали как описано выше. Раствор 4.2 г (31 ммоль) α-амино-β-хлормасляной кислоты (X) доводили до pH 9 добавлением 1 М раствора гидроксида натрия. В течение 30 мин полученный раствор α-амино-β-хлормасляной кислоты добавляли в раствор диселенида натрия и перемешивали в течение 12–16 ч при температуре 37°C. Добавляли в полученный раствор по каплям хлороводородную кислота до pH 2. Осуществляли продувку воздухом в течение 2–3 ч. Раствор фильтровали и пропускали со скоростью 1 мл/мин через хроматографическую колонку (20–25) × (1–2) см с катионитом КУ-2-8 в H⁺-форме. Колонку промывали 50 мл дистиллированной воды. Элюирование 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина проводили, пропуская через колонку 50 мл 6 М NH₄OH со скоростью 1 мл/мин и промывали 20–30 мл воды. Раствор концентрировали в вакууме и доводили pH до 6.2 раствором HCl. Осаждение аминокислоты из охлажденного раствора проводили избытком метанола (1 : 7) с добавлением 1–2% диэтилового эфира для понижения растворимости аминокислоты. Осадок промывали охлажденной смесью метанола и диэтилового эфира и высушивали в эксикаторе над молекулярными ситами 4А. Выход 3,3'-диметил-*L*-селеноцистина составляет не менее 50%, чистотой не менее 95% (ТСХ).

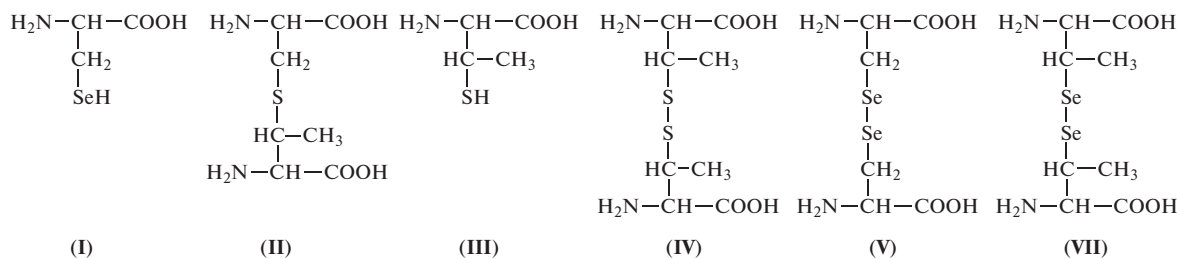
Изучение влияние различных форм селена на аккумулярование микроэлемента органами и тканями

проводили на самцах беспородных белых крыс, массой 180–200 г. Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО “Пензенский государственный университет” при свободном доступе к воде и корму. Животных разделили на группы – контрольную (1 группа – 0.1 М раствор соляной кислоты) и опытные (2 группа – селенит натрия, 3 группа – *L*-селеноцистин, 4 группа – 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин) по 10 животных в группе. Содержание и кормление животных опытных и контрольных групп было одинаковым, без добавок селена в рацион. Животные получали стандартный полусинтетический рацион (по МУ 1.2.2520-09). Все препараты растворяли в 0.1 М соляной кислоте и вводили в желудок с помощью металлического зонда с оливкой на конце. Препараты вводили крысам 1 раз в сутки в течение 1 месяца в дозе 1/10 от среднететальной дозы (LD₅₀): для *L*-селеноцистина [36] – 5.17 мг/кг (2.44 мг Se/кг), селенит натрия – 5.34 мг/кг (2.44 мг Se/кг), 3,3'-диметил-*L*-селеноцистин – 5.60 мг/кг (2.44 мг Se/кг). За экспериментальными животными следили в течение 30 сут.

По окончании опыта был проведен убой животных, путем забора крови из сонной артерии с последующей декапитацией, под эфирным наркозом. Кровь для исследования аминокислотного состава забиралась в пробирку без консерванта и через 2 ч центрифугировалась в течение 10 мин при 3000 об./мин для получения сыворотки.

Общее содержание селена определяли флуориметрическим методом с диаминафталином [37]. В качестве референс-стандартов в каждом определении использовали образцы яичного порошка и лиофилизированной мышечной ткани с регламентированным содержанием селена соответственно 630 и 394 мкг/кг.

При определении свободных аминокислот в сыворотке крови, получали концентрированный безбелковый экстракт по методике [38]. Дериватизация аминокислот проводилась фенилзотиоцианатом, а анализ фенилтиокарбамоильных аминокислот по методике [35], с использованием системы капиллярного электрофореза “Капель 105М”.



Блок формул.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pilon-Smits E.A.H.* Selenium in plants. Springer International Publishing: Switzerland, 2015. P. 93–107.
2. *Fairweather-Tait S.J., Bao Y., Broadley M.R., Collings R., Ford D., Hesketh J.E., Hurst R.* // Antioxidants and Redox Signal. 2011. V. 14. P. 1337–1383.
3. *Berry M.J., Banu L., Harney J.W., Larsen P.R.* // EMBO J. 1993. V. 12. P. 3315–3322.
4. *Yuan L., Zhu Y., Lin Z.Q., Banuelos G., Li W., Yin X.* // PLoS One. 2013. V. 8. P. 1–9.
5. *Block E.* // ACS Webinars: New York, 2014. P. 39.
6. *Johansson L., Gafvelin G., Amer E.S.* // Biochim Biophys Acta. 2005. V. 1726. P. 1–13.
7. *Kunwar A., Jayakumar S., Bhilwade H.N., Bag P.P., Bhatt H., Chaubey R.C., Priyadarsini K.I.* // Rad. Environ. Biophys. 2011. V. 50. P. 271–280.
8. *Kumar B.S., Kunwar A., Singh B.G., Ahmad A., Priyadarsini K.I.* // Biol. Trace. Elem. Res. 2011. V. 140. P. 127–138.
9. *Chen T., Wong Y.S.* // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 10574–10581.
10. *Chen T., Wong Y.S.* // Cell Mol. Life Sci. 2008. V. 65. P. 2763–2775.
11. *Шумилин А.О., Серегина И.И., Хрунов А.А., Белецкий С.Л., Полубояринов П.А.* // Проблемы агрохимии и экологии. 2016. № 1. С. 24–28.
12. *Полубояринов П.А., Невитов М.Н., Остапчук А.В., Цыганов С.В.* // Пчеловодство. 2016. № 3. С. 16–18.
13. *Полубояринов П.А., Воронин С.П., Егоров И.А., Андрианова Е.Н.* // Птицеводство. 2015. № 8. С. 9–12.
14. *Полубояринов П.А., Голубкина Н.А., Глебова Н.Н.* // Вестник Оренбургского государственного университета. 2016. № 10. С. 74–78.
15. *Dong Y., Lisk D., Block E., Ip C.* // Cancer Res. 2001. V. 61. № 7. P. 2923–2928.
16. *Kim T., Jung U., Cho D.Y., Chung A.S.* // Carcinogenesis. 2001. V. 22. P. 559–565.
17. *Weekley C.M., Aitken J.B., Finney L., Vogt S., Witting P.K., Harris H.H.* // Nutrients. 2013. № 5. P. 1734–1756.
18. *Alderton G.* // J. Am. Chem. Soc. 1953. V. 75. P. 2391–2392.
19. *Gross E., Kiltz H.H., Nebelin E.* // Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1973. V. 354. P. 810–812.
20. *Gross E., Morell J.L.* // J. Am. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 4634–4635.
21. *Downey P.F., Black S.* // J. Biol. Chem. 1957. V. 228. P. 171–179.
22. *Kido Y., Hamakado T., Yoshida T., Anno M., Motoki Y., Wakamiya T., Shiba T.* // J. Antibiot. 1983. V. 36. P. 1295–1299.
23. *Wakamiya T., Fukase K., Shimbo K., Shiba T.* // Chem. Soc. Jap. 1983. V. 56. P. 1559–1560.
24. *Chocat P., Esaki N., Tanaka H., Soda K.* // Anal. Biochem. 1985. V. 148. P. 485–489.
25. *Walsh C.T., Schonbrunn A., Abeles R.H.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 6855–6866.
26. *Физер Л., Физер М.* // Органическая химия. Углубленный курс. Том 2. М.: Издательство “Химия”, 1966. 783 с.
27. *Hasegawa T., Mihara M., Okuno T., Nakamuro K., Sayato Y.* // Arch. Toxicol. 1995. № 69. P. 312–317.
28. *Hasegawa T., Okuno T., Nakamuro K., Sayato Y.* // Arch. Toxicol. 1996. V. 71. P. 39–44.
29. *Esaki N., Nakamura T., Tanaka H., Soda K.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 4386–4391.
30. *Lubec C., Rosental J.A.* // N.Y. Escom. 1990. P. 1196.
31. *Глинник С.В., Ринейская О.Н., Романовский И.В., Красненкова Т.П.* // Медицинский журнал. 2007. № 3. С. 47–49.
32. *Scharff R., Wool I.G.* // Bioch. J. 1966. V. 99. P. 173.
33. *Phang J.M., Pandhare J., Liu Y.* // The Journal of Nutrition. 2008. V. 138. P. 2008–2015.
34. *Полубояринов П.А.* Патент № 2669771 РФ // Бюл. 2017. № 17.
35. М–04–38–2009. Методика определения протеиногенных аминокислот в кормах и сырье. ООО “Люмэкс–маркетинг”. СПб., 2014. 49 с.
36. *Полубояринов П.А., Дерягина В.П., Глебова Н.Н., Моисеева И.Я., Швец В.И.* // Биофармацевтический журнал. 2018. Т. 10. № 3. С. 76–81.
37. МУК 4.1.033–95. Определение селена в продуктах питания.
38. *Карпищенко А.И., Алексеев В.В., Алипов А.Н.* // Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Т.2. М.: 2013. 792 с.

Synthesis and Biological Activity of 3,3'-Dimethyl-L-Selenocystine – a New Selenocystine Derivative

P. A. Poluboyarinov*., #, N. A. Golubkina, A. A. Aniskov***, I. J. Moiseeva****, N. N. Glebova****, and V. I. Shvets*******

#Tel: 8(950)230-48-76; e-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

*Penza State University of Architecture and Construction, Titova st., 28, Penza, 440028 Russia

**Federal Scientific Center of Vegetable Production, VNISSOK, Seleccionnaya 14, Odintsovo district, Moscow region, 143072 Russia

***Saratov State University, Astrakhanskaya st., 83, Saratov, 410012 Russia

****Penza State University, Krasnaya st., 40, Penza, 440026 Russia

*****Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Vernadsky avenue 86, Moscow, 119571 Russia

Based on the known synthesis of L-selenocystine a new selenium containing amino acid 3,3'-dimethyl-L-selenocystine being an analog of natural sulfur containing amino acid was synthesized. Selenium of 3,3'-dimethyl-L-selenocystine is demonstrated to be accumulated in rats' liver, muscles and serum, where its concentration exceeds that of the control by 40.63, 14.07, and 22.98%, indicating bioavailability of this form of the element. L-Selenocystine and 3,3'-dimethyl-L-selenocystine decrease free amino acids concentration in serum of rats by 12.17 and 11.78%, and especially proline – a marker of organism stress – by 74.6 and 66.4% accordingly. Accumulation of selenium in liver and serum indicates close metabolism of L-selenocystine and its derivative – 3,3'-dimethyl-L-selenocystine.

Keywords: L-selenocystine, 3,3'-dimethyl-L-selenocystine, selenium, serum, amino acids, proline