

На правах рукописи

Губкин Андрей Александрович

Динитрозильные комплексы железа,  
S-нитрозотиолы и коэнзим Q как антиоксиданты  
в системах, моделирующих окислительный стресс

Специальность 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова и в НИИ экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Росздрава.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор  
Рууге Энно Куставич

Научный консультант: кандидат химических наук  
Шумаев Константин Борисович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор  
Петрусевич Юрий Михайлович

доктор биологических наук  
Реутов Валентин Палладиевич

Ведущая организация: Институт химической физики  
им. Н.Н. Семенова РАН

Защита диссертации состоится 21 ноября 2006 г. в «\_\_» часов на заседании диссертационного совета К 501.001.08 при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Физический факультет, аудитория \_\_\_\_ .

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «\_\_» октября 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета К 501.001.08  
кандидат физико-математических наук

Хомутов Г.Б.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

В настоящее время одной из актуальных задач в медицинской биофизике, физиологии и медицинской химии является изучение короткоживущих активных соединений, выполняющих функцию регуляторов на различных уровнях организации живых организмов. К таким молекулам, в первую очередь, относятся оксид азота (NO) и активные формы кислорода. В последние годы появляется все больше данных о новых физиологических функциях оксида азота и его метаболитов. Наряду с сигнальной ролью NO, важной областью исследований является взаимодействие оксида азота с активными формами кислорода. Возникающие в этих реакциях активные метаболиты азота – пероксинитрит, диоксид азота,  $\text{NO}_2\text{Cl}$  и др. являются важными компонентами иммунного ответа в организме человека и животных. С другой стороны, активные формы кислорода и азота участвуют в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом, в том числе атеросклероза, ишемической болезни сердца, нейродегенеративных заболеваний, катаракты, рака, диабета. В то же время, процессы взаимодействия активных форм кислорода с такими производными NO как S-нитрозотиолы (RSNO) и динитрозильные комплексы железа остаются мало изученными. Существенно, что сам оксид азота и S-нитрозотиолы в некоторых модельных системах проявляют антиоксидантные свойства. Предполагается, что одним из механизмов антиоксидантного действия NO является связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов. При этом ингибируются реакции свободно-радикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа. Перекисное окисление липидов ингибируется также благодаря взаимодействию NO с алкилпероксильными и алкоксильными радикалами. Оксид азота может защищать другие биологические молекулы от окислительной модификации, нитрозилируя гем и восстанавливая оксоферрилформы гемопротейдов.

Во многих работах в качестве возможных белков-переносчиков NO в кровотоке рассматриваются гемоглобин и альбумин. Цистеиновые остатки этих белков могут нитрозилироваться, в случае гемоглобина NO также связывается с железом гема. Показано, что при взаимодействии низкомолекулярных ДНКЖ с гемоглобином и альбумином образуются ассоциированные с этими белками динитрозильные комплексы железа. Они, так же как и низкомолекулярные ДНКЖ могут играть важную роль в условиях окислительного стресса.

Известно, что супероксид влияет на образование S-нитрозогемоглобина и стимулирует высвобождение NO из S-нитрозоальбумина. Редокс-реакции с участием гемоглобина играют важную роль в ходе окислительного стресса. Установлено, что гемоглобин может стимулировать перекисное окисление белок-липидных комплексов. В ряде статей высказано предположение, что динитрозильные комплексы железа с белками могут участвовать в защите клеток от цитотоксического действия активных форм кислорода. Так как белковые динитрозильные комплексы ответственны за многие физиологические функции NO в организме человека, большое значение имеет изменение их концентрации под действием активных форм кислорода.

В условиях окислительного стресса происходит истощение большинства эндогенных антиоксидантов. В связи с этим, несомненно, актуальным является выяснение влияния производных оксида азота на концентрацию важнейшего липофильного антиоксиданта убихинона (коэнзима Q). Высокая эффективность коэнзима Q связана с тем, что он может регенерировать витамин E (токоферол) и сам восстанавливается ферментами дыхательной цепи митохондрий или аскорбатом. Однако убихинон может также способствовать генерации супероксидного радикала. Следовательно, взаимодействие убихинона с производными оксида азота может иметь неоднозначный характер.

Таким образом, реакции активных форм кислорода с содержащими ион нитрозония производными оксида азота (RSNO и динитрозильными

комплексами железа) могут играть чрезвычайно важную роль как в нормальных условиях существования живого организма, так и в ходе патологических процессов возникающих в результате окислительного стресса. Исследование механизмов взаимодействия производных оксида азота и активных форм кислорода особо актуально, так как они могут определять баланс антиоксидантных и прооксидантных реакций в клетке, а также влиять на концентрацию оксида азота, который является универсальным регулятором многих метаболических путей и физиологических эффектов.

#### Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось изучение физиологических роли взаимодействия активных форм кислорода с производными оксида азота, содержащими ион нитрозония, и влияния на эти процессы коэнзима Q (убихинона).

Исходя из поставленной в диссертационной работе цели, решались следующие задачи:

1. Изучить взаимодействие низкомолекулярных динитрозильных комплексов с активными формами кислорода и органическими гидропероксидами.
2. Исследовать особенности реакций ассоциированных с гемоглобином и альбумином динитрозильных комплексов с активными формами кислорода и пероксинитритом.
3. В системах, моделирующих окислительный стресс, исследовать влияние динитрозильных комплексов железа и S-нитрозоглутатиона на характеристики индуцированного железосодержащими белками перекисного окисления препаратов миокарда.
4. Изучить действие S-нитрозоглутатиона на окислительную деструкцию липофильных антиоксидантов: коэнзима Q и  $\beta$ -каротина, а также взаимодействие в этих условиях коэнзима Q и S-нитрозоглутатиона.

### Научная новизна диссертации.

1. Методом спектроскопии ЭПР изучены процессы взаимодействия низкомолекулярных и белковых динитрозильных комплексов с активными формами кислорода.
2. Впервые установлено, что различия кинетик деструкций ассоциированных с альбумином и гемоглобином динитрозильных комплексов под действием пероксида водорода, гидропероксида трет-бутила и пероксинитрита обусловлены гемовой группой.
3. При изучении взаимодействия различных типов динитрозильных комплексов с пероксидом водорода впервые показано, что входящее в состав этих комплексов железо не участвует в реакции Фентона.
4. Продемонстрировано антиоксидантное действие динитрозильных комплексов и S-нитрозоглутатиона при перекисном окислении митохондрий кардиомиоцитов, индуцированное миоглобином и ферритином в сочетании с гидропероксидом трет-бутила.
5. Впервые обнаружено защитное действие S-нитрозоглутатиона в отношении убихинонов миокарда крысы в условиях моделирующих окислительный стресс.
6. Показано, что S-нитрозоглутатион и динитрозильные комплексы железа ингибируют окислительную деструкцию липофильного антиоксиданта  $\beta$ -каротина под действием свободных радикалов трет-бутила.

### Научно-практическая значимость исследования.

Представленные в диссертации экспериментальные данные проясняют механизмы взаимодействия динитрозильных комплексов железа с активными формами кислорода и могут быть использованы для лучшего понимания роли оксида азота и его производных в биологических системах. Процессы, изученные в данной работе, имеют большое значение для понимания механизмов действия фармакологических доноров оксида азота.

### Апробация результатов исследования и публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XI и XII международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам “Ломоносов-2004” и “Ломоносов-2005”, “Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии.” (Москва, 2005), IV международная научно-практическая конференция с международным участием “Активные формы кислорода, оксид азота антиоксиданты и здоровье человека” (Смоленск. 2005), III съезде биофизиков России (Воронеж 2004), XIV международной конференции и дискуссионном научном клубе “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” (Ялта-Гурзуф, 2006).

### Структура и объем диссертационной работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), методической части (глава 2), описания собственных результатов и их обсуждения (главы 3 – 7), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 111 страниц, включая 28 рисунков и графиков, 2 таблицы и список литературы из 148 наименований.

## КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** дана общая характеристика диссертационной работы, обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, кратко изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

**Первая глава** содержит литературный обзор, посвященный активным формам кислорода, оксиду азота и его производным. Кратко изложены основные физико-химические свойства активных форм кислорода и азота. Описаны их источники в биологических системах. Дана классификация NO-синтаз и представление о их функционировании, способах регуляции

ферментативной активности. Кратко изложена работа дыхательной цепи митохондрий с упором на образование ею активных форм кислорода, прежде всего супероксида. Описана ксантиноксидоредуктаза, даны ее основные функции и регуляция. В **разделе 1.3** кратко описано современное представление о взаимодействии активных форм кислорода и азота в клетке, рассказано о роли динитрозильных комплексов в этом взаимодействии. Отдельный раздел посвящен пероксинитриту, как одному из наиболее важных продуктов взаимодействия активных форм кислорода и азота, описаны его цитотоксические свойства. Заканчивает главу **раздел 1.4** о прооксидантных и антиоксидантных свойствах активных форм кислорода и азота, обобщаются данные о роли динитрозильных комплексов и S-нитрозоглутатиона. Целью обзора литературы было не только показать современное представление о разделе биофизики посвященном свободным радикалам кислорода и азота, но и показать место данной работы в этом разделе, обосновать актуальность поставленных в ней задач.

**Во второй главе** представлены материалы и методы исследования. **Раздел 2.1** посвящен регистрации спектров ЭПР. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), при комнатной температуре ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Условия регистрации спектров ЭПР: СВЧ мощность 5 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл для TIRON и СВЧ мощность 10 мВт, амплитуда ВЧ модуляции 0,4 мТл для ДНКЖ. Спектры феноксильного радикала пробуккола регистрировали при СВЧ мощности 50 мВт. В экспериментах с генерацией  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , для постоянства газового состава образцы помещали в тонкостенный (толщина стенок 0,00254 мм) тефлоновый капилляр фирмы Norell, Inc. (США), а запись спектров проводили при непрерывной продувке воздухом. В остальных случаях образцы помещались в стеклянные капилляры. Для определения скорости генерации свободных радикалов кислорода митохондриями использовали спиновую ловушку TIRON. В остальных случаях для определения скорости генерации радикалов кислорода использовали



спиновую ловушку DEPMPO. Регистрацию спектров спин-аддуктов DEPMPO проводили при тех же условиях что и для ДНКЖ: СВЧ мощность 5 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,1 мТл. В разделе 2.2 описывается получение препаратов и работа с ними. В работе использовали восстановленный глутатион (Calbiochem, США), цистеин, гидропероксид трет-бутила (Merk, Германия), пероксид водорода, ДТПА, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин N-оксид) (OXIS, США), TIRON (4,5 - диоксибензол - 1,3 - дисульфат натрия), супероксиддисмутазу, ксантиноксидазу, гемоглобин, метмиоглобин, гемин, пероксинитрит, диоксид калия ( $\text{KO}_2$ ), убихинон, ферритин и 2-тиобарбитуровую кислоту (Sigma, США) и некоторые другие. S-нитрозоглутатион (GSNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с глутатионом в диамагнитной димерной форме получали, смешивая 300 мМ  $\text{NaNO}_2$  и 200 мМ восстановленного глутатиона в кислой среде или растворы  $\text{FeSO}_4$  и глутатиона в молярном соотношении 1:2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO, соответственно. Препараты GSNO,  $\text{ONOO}^-$  и ДНКЖ хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Концентрацию ДНКЖ определяли методом спектроскопии ЭПР. Для генерации супероксида в разных экспериментах использовали систему ксантин-ксантиноксидаза или супероксид калия ( $\text{KO}_2$ ). При работе с ксантиноксидазой образец помещали в тонкостенный (толщина стенок 0,00254 мм) тефлоновый капилляр, как и при работе с митохондриями, а запись спектров проводили при непрерывной продувке воздухом. Пероксинитрит получали, смешивая охлажденные растворы 1 М  $\text{NaNO}_2$  и 1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 0,3 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , после чего быстро добавляли равный объем 1,4 М NaOH. Разделы 2.3 и 2.4 посвящены описанию получения изолированных митохондрий и определению их функциональной активности. Митохондрии выделяли из сердец крыс. Методика выделения митохондрий была стандартной. Животных усыпляли, используя 20% раствор уретана (1,8 мг/кг массы животного), который вводился в брюшную полость. Затем быстро извлекали сердце и помещали в охлажденную ( $4^\circ\text{C}$ ) среду выделения. Состав

среды выделения: 300 мМ сахараза, 10 мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоная кислота), 0,5 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота); pH 7.4. Измельченную ткань переносили в гомогенизатор (стекло-тефлон), добавляли 25-30 мл среды выделения в соответствии с соотношением 1:8 и гомогенизировали 2-3 минуты до превращения суспензии в гомогенную. Осаждение митохондрий производили в два этапа на центрифуге К-24 (ГДР). Полученный осадок митохондрий суспендировали в 150 мл БСА. Далее помещали в маленькую пробирку и хранили во льду или замораживая при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрация белка в митохондриальной суспензии, определенная по биуретовому методу, составляла 30-35 мг/мл. **Раздел 2.5** посвящен описанию инициирования перекисного окисления митохондрий и методу определения МДА. Свободнорадикальное окисление митохондрий индуцировали добавлением 400 мкМ гидропероксида трет-бутила и 100 мкМ метмиоглобина. В ряде экспериментов вместо метмиоглобина или совместно с ним добавляли ферритин (2,5 мг/мл). Образцы объемом в 1 мл инкубировались в течение 2 часов при  $37^{\circ}\text{C}$  после чего в них определялось содержание малонового диальдегида (МДА). Для этого к 0,5 мл инкубационной смеси, содержащей препарат митохондрий, добавляли 1,5 мл 1%-ной фосфорной кислоты,  $10^{-4}$  М ЭДТА,  $10^{-5}$  М ВНТ и 1 мл 0,5%-ного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), после чего инкубировали 45 мин при  $100^{\circ}\text{C}$ . После охлаждения смеси, комплекс МДА с ТБК экстрагировали н-бутанолом. В бутанольной фазе регистрировали спектр поглощения в области 515-550 нм. Концентрацию МДА рассчитывали по оптической плотности комплексов МДА-ТБК при 532 нм ( $\epsilon_{532} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [92]. Все оптические измерения проводили на спектрофотометрах Hitachi 557 (Япония) и

Beckman Coulter  $\Delta$  650 (США). При исследовании взаимодействия ДНКЖ с супероксидным радикалом ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), последний генерировали добавлением к реакционной смеси свежеприготовленного раствора

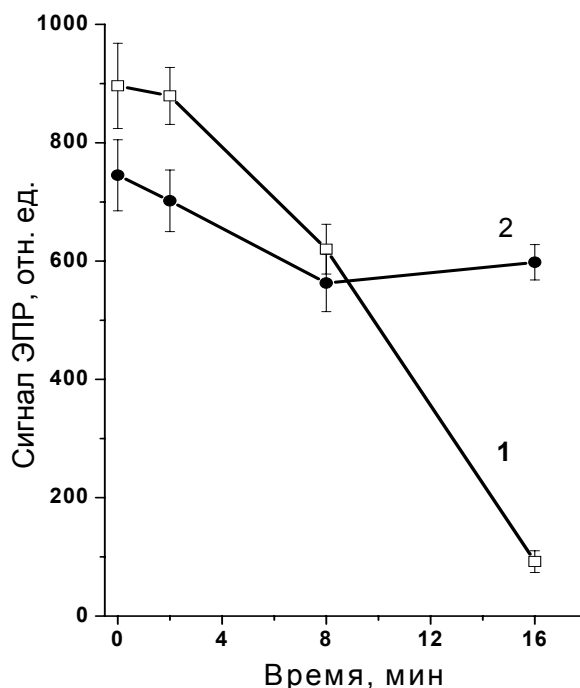
супероксида калия ( $\text{KO}_2$ ) в диметилсульфоксиде или использовали систему ксантин-ксантиноксидаза для ферментативной генерации  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

В третьей и последующих главах представлены непосредственно результаты исследований. **Третья глава** посвящена взаимодействию низкомолекулярных динитрозильных комплексов с активными формами кислорода и гидропероксидами. В данной работе факт генерации супероксидных радикалов митохондриями устанавливали при помощи спиновой ловушки TIRON. При инкубации митохондрий в присутствии субстратов дыхательной цепи не происходит существенного образования супероксида. При добавлении антимицина появляется сигнал аддукта спиновой ловушки с супероксидным радикалом. На рис.1 показана деструкция ДНКЖ при их инкубации с митохондриями из сердечной мышцы крыс в присутствии сукцината в качестве субстрата и антимицина А.

Рис.1. Деструкция динитрозильных комплексов с глутатионовыми лигандами при генерации супероксида митохондриями из сердца крысы.

1 – инкубационная среда + 0,2 мМ ДНКЖ + 1 мкг/мл антимицина А + 5 мМ сукцината;

2 – то же что и (1) + СОД (150 ед/мл) + каталаза (400 ед/мл).



В случае добавления в систему супероксиддисмутазы и каталазы, не происходило столь значительного падения сигнала, т.е. деструкцию динитрозильных комплексов вызывает именно супероксид, генерируемый дыхательной цепью митохондрий. Значительное падение сигнала динитрозильных комплексов говорит о

высокой скорости реакции между ними и супероксидным радикалом. Антиоксидантное действие ДНКЖ оценивали по ингибированию образования в системе гемин/ $H_2O_2$  феноксильного радикала пробукола. Последний является синтетическим антиоксидантом близким по структуре и механизму действия к  $\alpha$ -токоферолу. Из рис.2 видно, что ДНКЖ как с глутатионовыми так и с цистеиновыми лигандами (спектры 2 и 3), в молярных соотношениях, сравнимых с  $H_2O_2$  и гемом, более чем на 70% ингибируют образование радикала пробукола. Динитрозильные комплексы с фосфатными лигандами были несколько менее эффективны (~50% ингибирования) (рис.2, спектр 4).

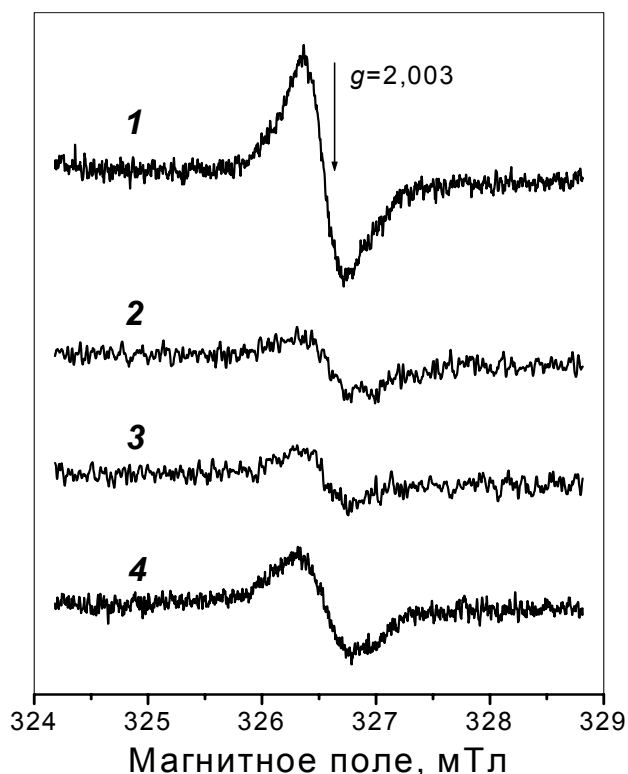
Рис.2. Влияние динитрозильных комплексов с различными лигандами на образование радикала пробукола. Реакционная смесь содержала: изопропанол/К,Na-фосфатный буфер, 1,5 мМ пробукола и 0,25 мМ гемина.

1 – спектр ЭПР феноксильного радикала пробукола образовавшегося после добавления в реакционную среду 2 мМ  $H_2O_2$ ;

2 – то же что и (1) + 0,5 мМ ДНКЖ, содержащих цистеин;

3 – то же что и (1) + 0,5 мМ ДНКЖ, содержащих глутатион;

4 – то же что и (1) + 0,5 мМ ДНКЖ с фосфат-анионом в качестве лиганда.



Таким образом, можно предположить, что тиольные лиганды наряду с другими компонентами динитрозильных комплексов, такими как  $NO^+$  и ионы железа, вносят свой вклад в снижение концентрации радикала пробукола. Образование феноксильного радикала может происходить при одноэлектронном окислении пробукола оксоферрилформой гемина или гидроксильным радикалом (рис.2). Представляется вероятным, что эти активные окислители, образуются при взаимодействии гемина с  $H_2O_2$ .

**Четвертая глава** посвящена ферритину и миоглобину, их участию в развитии окислительного стресса. В литературе появляется все больше данных о связи метаболизма ферритина, активных форм кислорода и NO. Так, ферритин может участвовать в образовании нитрозильных комплексов железа. Синтез самого ферритина регулируется оксидом азота, а проходящая с участием ферритина, микросомальная продукция активных форм кислорода, ингибируется донорами NO. В то же время, возможное влияние миоглобина и ферритина на окислительную модификацию митохондрий изучено недостаточно. В данной работе было исследовано свободнорадикальное окисление митохондрий, индуцированное сочетанием гидропероксида трет-бутила с метмиоглобином или их комбинацией с ферритином. На рис.3 представлены результаты изучения влияния S-нитрозоглутатиона (GSNO), GSH и ДНКЖ на образование вторичных продуктов перекисного окисления (МДА) в препарате митохондрий из миокарда крысы.

Рис.3. Накопление МДА.

1 - препарат митохондрий (0,5 мг белка/мл), Na,K-фосфатный буфер и 400 мкМ гидропероксида трет-бутила;

2 – то же, что и (1) плюс 100 мкМ метмиоглобина;

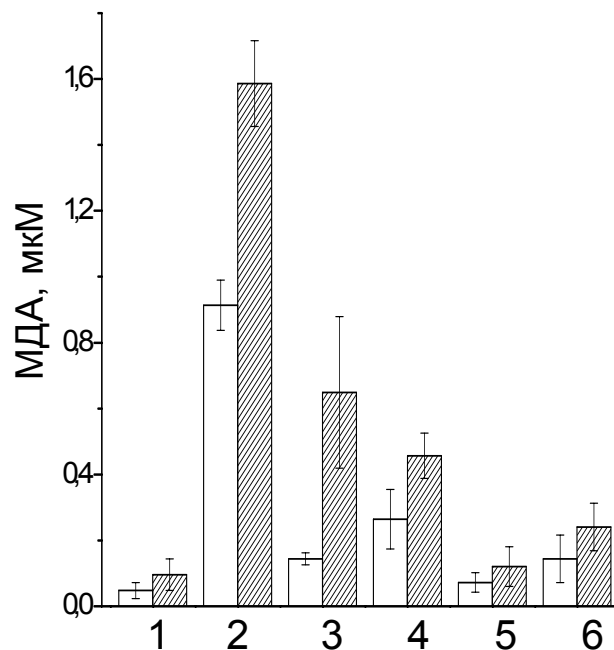
3 - то же, что и (2) плюс 100 мкМ GSNO;

4 - то же, что и (2) плюс 200 мкМ GSH;

5 - то же, что и (2) плюс 100 мкМ GSNO и 200 мкМ GSH;

6 - то же, что и (2) плюс 50 мкМ ДНКЖ.

В серии параллельных экспериментов в среду инкубации добавляли 2,5 мкг/мл ферритина (заштрихованные столбики).



Образование МДА наиболее

эффективно подавлялось под действием ДНКЖ (рис.3 столбец 6), а также при сочетанном действии GSNO и GSH (рис.3 столбец 5). Следует отметить, что в последнем случае возможно формирование ДНКЖ при взаимодействии

GSNO, GSH и ионов железа, содержащихся в реакционной среде. Накопление МДА при окислении мембран митохондрий индуцированным гидропероксидом трет-бутила в сочетании с метмиоглобином и ферритином было достоверно выше, чем в присутствии гидропероксида трет-бутила и миоглобина (рис.3 столбец 2).

На рис.4 представлены кинетики деструкции ДНКЖ при ферментативной генерации  $O_2^{\cdot-}$  в системе ксантин - ксантинооксидаза.

Рис.4. Кинетики деструкции ДНКЖ в условиях ферментативной генерации супероксид-анион радикала.

Реакционная среда содержала:

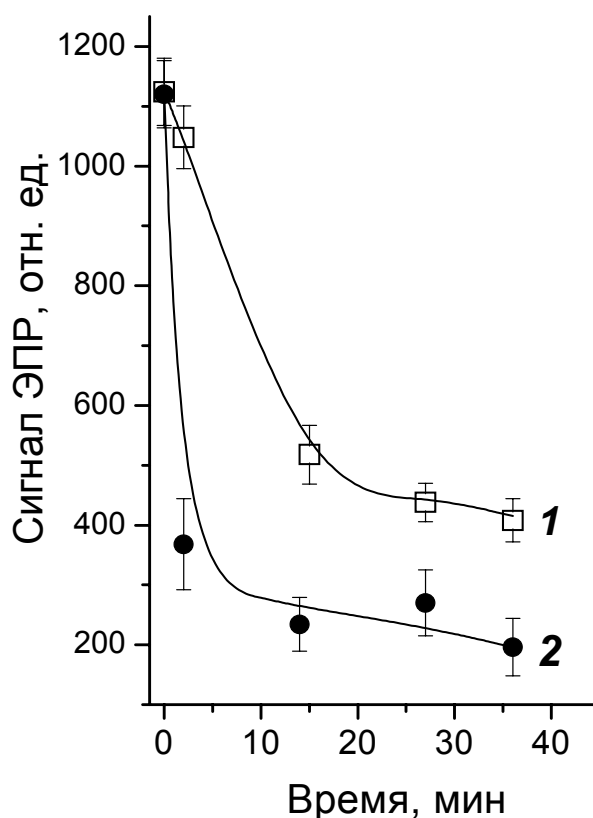
1 – 100 мМ Na,K-фосфатного буфера рН 7,4, 0,2 мМ 1 мМ ксантина, 0,2 ед./мл ксантинооксидазы, 120 мкМ ДНКЖ;

2 – то что и (1) плюс 100 мкМ метмиоглобина.

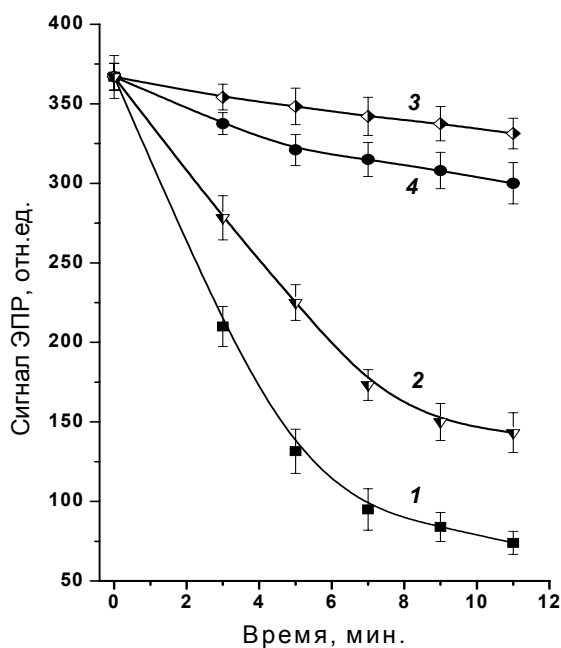
В присутствии метмиоглобина скорость распада ДНКЖ резко возрастает (рис.4 кривая 2),

однако, этот эффект почти полностью снимается каталазой. Полученные результаты указывают на то, что снижение ЭПР-детектируемой концентрации ДНКЖ происходит как под действием  $O_2^{\cdot-}$ , так и гидроксильного радикала, возникающего в условиях эксперимента в реакции между  $H_2O_2$  и метмиоглобином.

Высокая антиоксидантная активность ДНКЖ, позволяет заключить, что при взаимодействии этого комплекса NO с  $O_2^{\cdot-}$ , по-видимому, не происходит образования пероксинитрита.



**Пятая глава** посвящена взаимодействию белковых динитрозильных комплексов с активными формами кислорода. В **разделе 5.1** описано исследование взаимодействия белковых ДНКЖ с супероксидом, ферментативно генерируемым в системе ксантин-ксантинооксидаза. На рис.5 и 6 представлены кинетики гибели альбуминовых и гемоглобиновых ДНКЖ, соответственно, под действием супероксида.



Кинетика деструкции альбуминовых и гемоглобиновых ДНКЖ в условиях ферментативной генерации супероксида.

Рис.5.

(1) – Na-фосфатный буфер, альбуминовые ДНКЖ (560μM), ДТПА (1,6мM), ксантин (3,5мM), ксантинооксидоредуктаза (0,6 ед./мл);  
 (2) – (1) + СОД (25 ед./мл);  
 (3) – (1) + СОД (400 ед./мл);  
 (4) – кинетика гибели альбуминовых ДНКЖ в реакционной среде без ксантина. Концентрация альбумина 16,5 мг/мл.

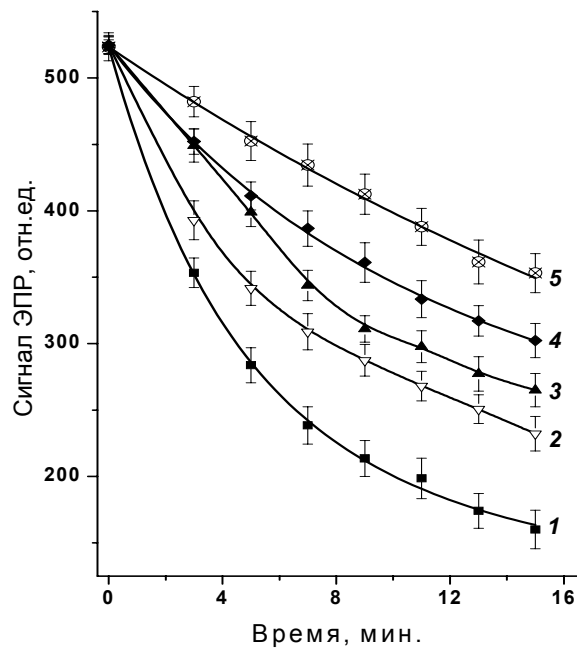


Рис.6.

(1) – Na-фосфатный буфер, гемоглобиновые ДНКЖ (540μM), ДТПА (1,6мM), ксантин (3,5мM), ксантинооксидоредуктазу (0,6 ед./мл);  
 (2) – (1) + СОД (100 ед./мл);  
 (3) – (1) + СОД (400 ед./мл);  
 (4) – (2) + каталаза (600 ед./мл);  
 (5) – кинетика спонтанной деструкции гемоглобиновых ДНКЖ в реакционной среде без ксантина.

Представляется вероятным, что разница в кинетиках гибели альбуминовых и гемоглобиновых динитрозильных комплексах связана с

взаимодействием гема с пероксидом водорода, в результате которого возникают активные интермедиаты, способные внести свой вклад в деструкцию гемоглибиновых ДНКЖ. При взаимодействии пероксида водорода с гемом образуется феррилгемоглибин, являющийся сильнейшим окислителем. В данных условиях динитрозильные комплексы оказываются способными эффективно восстанавливать феррилгемоглибин, фактически выступая в роли антиоксидантов. Это может иметь большое значение для тканей с высоким содержанием гемопротеидов, находящихся в условиях окислительного стресса.

В разделе 5.2 описано взаимодействие динитрозильных комплексов с пероксидом водорода и гидропероксидом трет-бутила. В присутствии пероксидов наблюдалось существенное снижение концентрации ДНКЖ. Было показано, что гидропероксид трет-бутила более эффективно разрушает гемоглибиновые ДНКЖ. Это можно объяснить возникновением активных интермедиаторов при взаимодействии гема с пероксидом водорода и гидропероксидом трет-бутила. Такими интермедиатами являются оксоферрилгемоглибин, протеиновые радикалы гемоглибина и алкилперекисные радикалы.

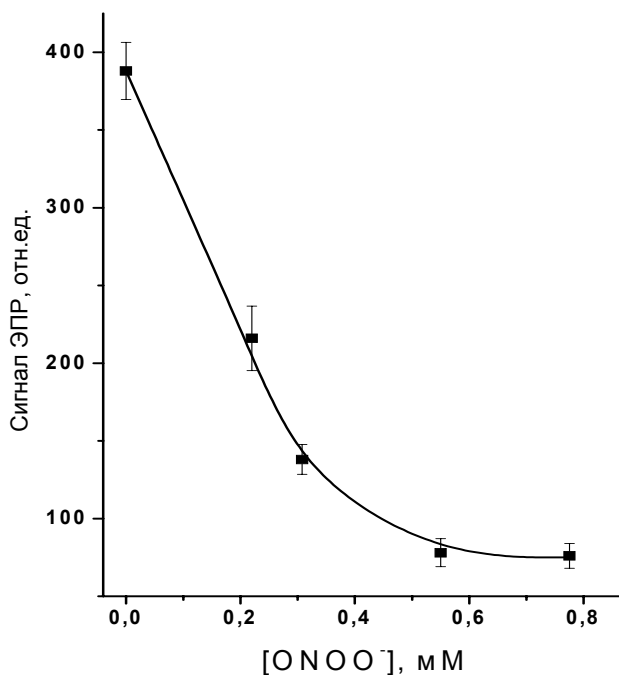
В разделе 5.3 описано исследование образования димеров субъединиц гемоглибина, образующихся вследствие возникновения дисульфидной связи между цистеинами  $\beta$ -93 и димеризации тирозиновых свободных радикалов в результате окислительной модификации. В ходе вызванной пероксидом водорода деструкции гемоглибиновых ДНКЖ можно было бы ожидать окисление цистеиновых  $\beta$ -93, входящих в состав динитрозильных комплексов, и образования дисульфидной связи. Однако, связанные с гемоглибином ДНКЖ в концентрациях, эквимолярных пероксиду водорода, почти полностью ингибируют димеризацию субъединиц, т.е. в случае с гемоглибиновыми ДНКЖ не происходит окисления цистеинов молекулы гемоглибина. Причем взаимодействие этих ДНКЖ с пероксидом водорода не приводит к генерации свободных радикалов в реакции Фентоновского типа и



возникновению дисульфидных связей, т.е. железо, входящее в состав динитрозильных комплексов, само по себе, не вызывает разложение пероксида водорода.

Таким образом, гемоглобиновые ДНКЖ действуют как антиоксиданты, защищая белок, с которым они связаны, от окислительной модификации. Стоит отметить, что образование белковых ДНКЖ носит обратимый характер и не нарушает функциональной активности белка. Антиоксидантное действие ДНКЖ, показанное в этом эксперименте, не носит специфический характер по отношению к гемоглобину и также может реализовываться в случае других белков. В разделе 5.4 описано исследование взаимодействия альбуминовых и гемоглобиновых ДНКЖ с пероксинитритом. В результате диффузионно-контролируемой реакции супероксида с оксидом азота образуется один из наиболее мощных биологических окислителей – пероксинитрит. Невысокие концентрации оксида азота и супероксида компенсируются высокой константой скорости реакции. Представляется вероятным, что пероксинитрит может вызывать окислительную деструкцию белковых ДНКЖ, как в физиологических условиях, так и в модельных системах.

Рис.7. Деструкция альбуминовых ДНКЖ под действием различных концентраций пероксинитрита в Na-фосфатном буфере (0,2 М, рН 7,4), содержащем ДТПА (1,6 мМ). Концентрация альбумина 16,5 мг/мл. Концентрация альбуминовых ДНКЖ (560  $\mu$ М).



На рис.7 и 8 представлены кривые зависимости деструкции альбуминовых и гемоглобиновых ДНКЖ от концентрации пероксинитрита.

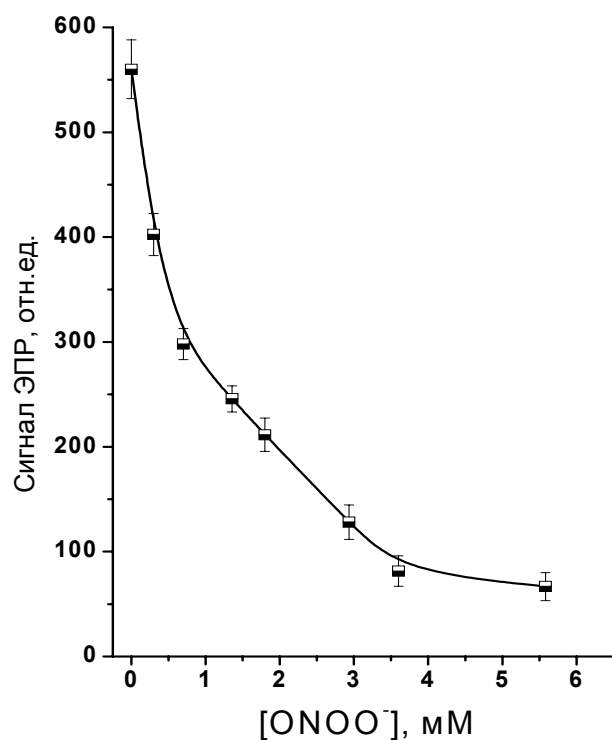


Рис.8. Деструкция гемоглибиновых ДНКЖ под действием различных концентраций пероксинитрита в Na-фосфатном буфере (0,2 М, рН 7,4), содержащем ДТПА (1,6 мМ). Концентрация гемоглибина 16,3 мг/мл (288  $\mu\text{M}$ ). Концентрация гемоглибиновых ДНКЖ (540  $\mu\text{M}$ ).

Хорошо видно, что альбуминовые ДНКЖ почти на порядок более чувствительны к действию

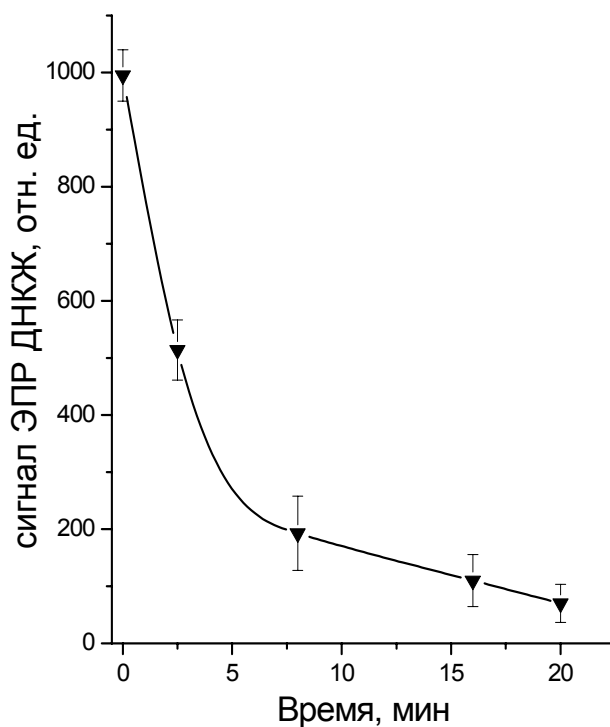
пероксинитрита, чем ДНКЖ, ассоциированные с гемоглибином. Этот факт может быть связан как с большей доступностью альбуминовых ДНКЖ, так и с возможным взаимодействием пероксинитрита с гемом этих белковых молекул. Интересно, что перелом в концентрационной зависимости деструкции гемоглибиновых ДНКЖ соответствует молярному соотношению гем/ $\text{ONOO}^-$ , равному 2. Это косвенно подтверждает предположение, что именно геммы  $\beta$ -субъединиц гемоглибина частично нейтрализуют пероксинитрит.

**Шестая глава** посвящена описанию взаимодействия оксоферрилмиоглибина с динитрозильными комплексами. Известно, что в деструктивных процессах, развивающихся в ходе окислительного стресса, определенную роль играют миоглибин, гемоглибин и другие гемопротеиды. В реакциях между гемопротеидами и органическими гидропероксидами возникают алкоксильные и алкилпероксильные радикалы, являющиеся интермедиатами свободнорадикального окисления липидов. С другой стороны, при взаимодействии перекиси водорода или органических гидропероксидов с гемопротеидами образуется оксоферрилгем (порфирин-

Fe<sup>IV</sup>=O), также способный вызывать окислительную модификацию биологически важных молекул. В ряде работ показано, что оксид азота (NO) снижает прооксидантное действие оксоферрилгемопротеидов и восстанавливает их до ферриформы (порфирин-Fe<sup>III</sup>).

Образование оксоферрилмиоглобина, наблюдалось в системе содержащей метмиоглобин и гидропероксид трет-бутила. Восстановление оксоферрилмиоглобина сопровождалось быстрым снижением концентрации ДНКЖ, которая контролировалась по характерному для динитрозильных комплексов железа сигналу ЭПР (Рис.9).

Рис.9. Кинетика деструкция 0,15 мМ ДНКЖ (по изменению сигнала ЭПР) в процессе инкубации с 0,1 мМ метмиоглобином в присутствии 0,4 мМ гидропероксида трет-бутила. Перед регистрацией спектров ЭПР к образцам добавляли 4 мМ цистеин.



Этот факт согласуется с выдвинутым нами предположением о способности ДНКЖ взаимодействовать с органическими свободными радикалами и оксоферрилмиоглобином.

В модельной системе, содержащей гидропероксид трет-бутила и метмиоглобин, весьма сложно было установить вклад в деструкцию ДНКЖ свободных радикалов с одной стороны и оксоферрилформы миоглобина с другой. Для определения этого вклада мы исследовали влияние на ДНКЖ только оксоферрилмиоглобина. Последний получали в реакции метмиоглобина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, избыток которой удалялся каталазой. Взаимодействие

ДНКЖ с оксоферрилмиоглобином действительно вызывало деструкцию исследуемых комплексов, причем этот процесс сопровождался восстановлением оксоферрилгема до его метформы, однако это снижение было не столь значительно как в системах содержащих гидропероксид трет-бутила. Исходя из этого мы полагаем, что одной из важных функций нитрозильных комплексов железа *in vivo* является детоксикация образующихся при окислительном стрессе оксоферрилформ гемопротеидов.

**В седьмой главе** описано исследование взаимодействия убихинола и GSNO в условиях моделирующих окислительный стресс. Известно, что в ходе свободнорадикального окисления биологических мембран происходит быстрое снижение концентраций липофильных антиоксидантов. При интенсивной генерации свободных радикалов возможна окислительная деструкция молекул этих антиоксидантов. В связи с этим, наиболее объективным параметром оценки влияния окислительного стресса на белок-липидные комплексы является измерение концентрации липофильных антиоксидантов. При изучении свободнорадикального перекисного окисления гомогената миокарда крыс мы оценивали изменение концентрации различных форм убихинона. Перекисное окисление инициировалось гидропероксидом трет-бутила. Было показано, что деструкцию убихинона хорошо ингибирует S-нитрозоглутатион. Защитное действие GSNO в ходе перекисного окисления гомогената согласуется с высокой антиоксидантной эффективностью производных оксида азота, содержащих катион нитрозония, продемонстрированных нами в других модельных системах.

**В заключении** подведены итоги и сформулированы выводы диссертационной работы.

## ВЫВОДЫ

1. В системе содержащей гемопротеиды в сочетании с  $\text{H}_2\text{O}_2$  или гидропероксидом трет-бутила, а также в условиях генерации супероксидного анион-радикала происходит быстрый распад низкомолекулярных и белковых динитрозильных комплексов железа.
2. Обнаружено, что ассоциированные с гемоглобином динитрозильные комплексы железа могут защищать этот гемопротеид от окислительной модификации под действием перекиси водорода.
3. Установлено, что S-нитрозоглутатион и содержащие глутатион динитрозильные комплексы железа эффективно защищают митохондриальные мембраны от индуцированного миоглобином и ферритином свободнорадикального перекисного окисления. Показано также, что S-нитрозоглутатион предотвращает деструкцию убихинона в ходе перекисного окисления гомогената миокарда крысы.
4. Показано, что S-нитрозоглутатион и динитрозильные комплексы железа ингибируют окислительную деструкцию липофильного антиоксиданта  $\beta$ -каротина под действием пероксинитрита. В то же время это антиоксидантное действие S-нитрозоглутатиона снижается в присутствии восстановленного убихинона.
5. Показано что, комплексы  $\text{NO}^+$  могут играть роль антиоксидантов защищающих биологические молекулы от активных форм кислорода и азота, причем их взаимодействие с кислородными радикалами и пероксинитритом может регулировать уровень оксида азота в биологических системах.

Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

1. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свиряева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса // Биофизика, 2006, т. 51, №3, 472-477.

2. Заббарова И.В., Шумаев К.Б., Ванин А.Ф., Губкин А.А., Петрова Н.Е., Рууге Э.К. Взаимодействие ферритина и миоглобина как индукторов перекисного окисления липидов, роль активных форм кислорода и азота // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 659-665.

3. Тимошин А.А., Лакомки В.Л., Губкин А.А., Рууге Э.К. Влияние коэнзима Q<sub>10</sub> на свободнорадикальные центры ткани изолированного миокарда крысы // Биофизика. 2003. Т. 48. вып. 4. С. 717-721.

4. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Губкин А.А., Гудков Л.Л., Ланкин В.З., Ванин А.Ф. Антиоксидантные и прооксидантные свойства метаболитов оксида азота // XIV Международная конференция и дискуссионный научный клуб. “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии.” Ялта-Гурзуф. 31 мая - 9 июня. 2006. Т. 8. С. 416-417.

5. Шумаев К.Б., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Губкина С.А., Губкин А.А., Гудков Л.Л., Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие с активными формами кислорода как механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа и S-нитрозоглутатиона. // IV международная научно-практическая конференция с международным участием “Активные формы кислорода, оксид азота антиоксиданты и здоровье человека”. Смоленск. 26-30 сентября. 2005. Сборник трудов. С. 114-115.

6. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Каленикова Е.И., Топунов А.Ф., Рууге Э. К. Антиоксидантная роль производных оксида азота содержащих катион нитрозония. // Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии. Медицинская физика. 21-24 июня 2005. С. 375.

7. Гудков Л.Л., Губкин А.А., Шумаев К.Б. Антиоксидантные процессы и активные формы азота в ткани сердечной мышцы // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам “Ломоносов-2005” апрель 2005. Сборник тезисов. Т. 1. С. 201.

8. Тимошин А.А., Орлова Ц.Р., Губкин А.А., Ванин А.Ф., Капелько В.И., Рууге Э.К. Применение комплекса N-митил-D-глюкомин дитиокарбомата (MGD) и железа для регистрации уровня радикалов оксида азота в организме // III съезд биофизиков России. Воронеж. 24-29. 2004. Сборник тезисов. С. 385-386.

9. Губкин А.А., Лакомкин В.Л., Тимошин А.А. Влияние потребления коэнзима Q<sub>10</sub> сократительную и митохондриальную функции миокарда // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам “Ломоносов-2004” апрель 2004. Сборник тезисов. Т. 1. С. 214.

10. Timoshin A.A., Lakomkin V.L., Shumaev K.B., Gubkin A.A., Kapelko V.I., Ruuge E.K. Coenzyme Q<sub>10</sub> containing water-soluble substance Kudesan as a potential cardiac protector and oxygen radical scavenger // International conference “Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and human health” Smolensk. September. 22-25. 2003. Abstracts. P. 69.