

На правах рукописи

Гудков Леонид Леонидович

**МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА В ПРОЦЕССАХ  
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ  
СИСТЕМАХ И ТКАНИ МИОКАРДА.**

Специальность 03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008

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

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор

Рууге Энно Куставич

Научный консультант: кандидат биологических 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 октября 2008 г. в «16» часов на заседании диссертационного совета Д 501.002.11 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, аудитория 5-19.

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

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.002.11

доктор физико-математических наук

Хомутов Г.Б.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования.**

Сердечно-сосудистые заболевания являются в настоящее время одной из наиболее распространенных причин смерти людей в современном обществе. Непрерывная и эффективная работа сердечной мышцы, осуществляющей кровоснабжение организма, требуют надежного и устойчивого энергоснабжения. Основным процессом, ответственным за выработку необходимых для работы миокарда макроэргических фосфатов, является окислительное фосфорилирование, протекающее в митохондриях кардиомиоцитов. Для поддержания нормальной работы митохондрий и, соответственно, адекватной энергозатратам миокарда выработки АТФ требуется постоянное и эффективное снабжение ткани сердца кислородом и субстратами дыхания. Питание сердечной мышцы – миокарда – происходит через собственные, так называемые коронарные сосуды. Временная или постоянная окклюзия коронарных сосудов затрудняет кровоснабжение питаемого участка сердечной мышцы, вследствие чего возникает ишемия. Ишемия характеризуется пониженным синтезом АТФ, ацидозом, снижением возбудимости клеток миокарда. Восстановление нормального кровотока (реперфузия) ишемизированного участка миокарда является необходимым условием сохранения нормальной работы сердечной мышцы. Однако обнаружено, что следующая за длительной ишемией реперфузия сопровождается значительными тканевыми повреждениями и нарушениями сократительной способности – появлением аритмии и временной механической дисфункции. Это явление, получившее название «кислородный парадокс», обусловлено резким усилением генерации активных форм кислорода при восстановлении нормального уровня внутриклеточной концентрации молекулярного кислорода. Все вышеперечисленные факторы, в конечном счете, могут привести к гибели части ткани миокарда и впоследствии целого организма. В настоящее время обнаружено, что существует по крайней мере две формы гибели клеток сердечной мышцы при ишемическом/реперфузионном повреждении. Классической формой гибели является некроз – или спонтанная клеточная гибель, не требующая затрат АТФ. Некротическое разрушение ткани характеризуется разрывом плазматической мембраны клетки, распадом

клеточных органелл, диффузным разрушением ДНК, развитием воспаления, отсутствием четкого механизма процесса гибели клетки. Однако, все большее количество исследований свидетельствует о том, что помимо некротической гибели клеток, в формировании инфаркта миокарда участвует также апоптоз. Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток, представляет собой развившийся в ходе эволюции, физиологический механизм клеточной гибели, играющий важную роль в развитии иммунного ответа, уничтожении мутировавших клеток, селекции Т-лимфоцитов и формировании органов во время эмбриогенеза. В отличие от некроза, апоптотическая гибель клетки не вызывает воспаления, внутриклеточное содержимое не выбрасывается во внеклеточное пространство, сам процесс имеет достаточно четкие этапы и требует затрат АТФ. В связи с этим предполагается, что ингибирование апоптоза на различных стадиях позволит спасти часть клеток и ткани от гибели при ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда. Анализ литературных данных показывает, что на ранних стадиях реперфузии основным событием, инициирующим апоптоз, является нарушение в работе митохондрий, в то время как на поздних стадиях основным инициатором апоптоза является иммунная система. Показано, что ингибирование апоптоза на поздних стадиях реперфузии позволяет сократить зону гибели миокарда. Можно предположить, что ингибирование апоптоза на ранних этапах реперфузии либо не будет иметь положительного эффекта, либо вызовет увеличение зоны инфаркта, вследствие переключения типа гибели клетки на более разрушительный некроз. К сожалению, исследования на ранних этапах реперфузии не дают четкого ответа на этот вопрос, вследствие смешенного типа клеточной гибели в использованных моделях. Разработка более адекватной модели ишемического повреждения миокарда для исследования апоптоза кардиомиоцитов на ранних этапах реперфузии имеет важное практическое значение.

Наряду с активными формами кислорода, существенную роль в патологических процессах, развивающихся при ишемии и последующей реперфузии миокарда, играют активные формы азота и их метаболиты. К последним относятся оксид азота ( $\text{NO}^\bullet$ ), нитроксильный анион ( $\text{NO}^-$ ), катион нитрозония ( $\text{NO}^+$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), диоксид азота ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), нитрит анион

(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), а также другие физиологически значимые производные NO. *In vivo* оксид азота генерируется NO-синтазами, которые катализируют превращение L-аргинина в L-цитруллин. Наиболее вероятными формами депонирования NO в клетках являются S-нитрозотиолы (RS-NO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), обнаруживаемые в клетках и тканях животных, продуцирующих оксид азота по L-аргинин – зависимому пути. Оксид азота и его метаболиты играют важную роль в большом числе физиологических процессов, среди которых регуляция кровяного давления, регуляция образования тромбов, нейромедиаторная функция, защита организма от патогенов, регуляция апоптоза и другие.

По имеющимся в литературе данным оксид азота и его метаболиты проявляют как цитопротекторные, так и цитотоксические свойства в моделях ишемии/реперфузии ткани и свободнорадикального (окислительного) стресса. Различия в экспериментальных данных могут проявляться в связи с использованием существенно отличающихся моделей, а также в связи с применением широкого спектра веществ, являющихся донорами NO, которые сами по себе могут проявлять различные химические свойства. Некоторые из них являются физиологическими донорами и в то же время метаболитами оксида азота, например нитрозотиолы, ДНКЖ и нитрит, другие синтетическими веществами, не имеющими физиологических аналогов. Кроме того, как было отмечено выше, оксид азота обладает широким спектром действия на клеточном и организменном уровне. В связи с этим, интерпретация данных полученных при ишемии и последующей реперфузии в организмах животных и культурах клеток весьма затруднительна. По сути дела в подобных моделях можно оценить только интегральный эффект экзогенных доноров NO. Действительно, оксид азота может увеличивать кровоток ишемизированного участка за счет активации гуанилатциклазы, ингибировать агрегацию тромбоцитов, уменьшать перекисное окисление липидов, обрывая цепные свободнорадикальные реакции. С другой стороны, пероксинитрит – продукт реакции NO с супероксидным анион-радикалом – способен окислять и нитрозировать важнейшие клеточные компоненты, а сам оксид азота способен ингибировать различные клеточные ферменты.

В диссертационной работе изучено влияние широкого спектра метаболитов и доноров оксида азота на процессы перекисного окисления липидов с использованием модели свободнорадикального окисления гомогената миокарда. Это позволило нам, с одной стороны, изучить и сравнить действие широкого класса веществ на одной модели и при этом сконцентрироваться только на одном из наиболее серьезных аспектов ишемического/реперфузионного повреждения тканей. С другой стороны, в модели свободнорадикального окисления гомогената миокарда представлен полный набор внутриклеточных компонентов кардиомиоцитов, с которыми может взаимодействовать оксид азота и его метаболиты *in vivo*, при этом нам удастся не рассматривать такие физиологические аспекты действия NO, как вазодилатация. Особый интерес представляет исследование малоизученных в настоящее время прооксидантных и антиоксидантных свойств таких метаболитов NO как динитрозильные комплексы железа, являющихся одними из наиболее вероятных форм депонирования оксида азота в клетке

### **Цель работы**

Целью работы является изучение влияния длительности ишемии на баланс апоптической/некротической гибели клеток миокарда, а также выяснения закономерностей антиоксидантного и прооксидантного действия метаболитов оксида азота в системах моделирующих свободнорадикальное окисление ткани сердечной мышцы.

### **Задачи работы**

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

1. На модели региональной ишемии/реперфузии сердца крысы определить оптимальную длительность ишемии для исследования апоптоза кардиомиоцитов на ранних этапах реперфузии.
2. Исследовать влияние синтетических доноров оксида азота и нитроксильного аниона на характеристики индуцированного гидроперекисью трет-бутила и железосодержащими белками перекисного окисления препаратов миокарда.

3. В системах, моделирующих окислительный стресс, исследовать влияние физиологических метаболитов оксида азота: динитрозильных комплексов железа, S-нитрозоглютатиона и нитрит аниона на характеристики индуцированного гидроперекисью трет-бутила и железосодержащими белками перекисного окисления препаратов миокарда.
4. Исследовать влияние различных метаболитов оксида азота и его производных на деструкцию убихинона препаратов миокарда вызванную гидроперекисью трет-бутила и железосодержащими белками.

#### **Научная новизна диссертации.**

1. Впервые установлено, что ДНКЖ, связанные с декстраном, и ДНКЖ, ассоциированные с бычьим сывороточным альбумином, ингибируют перекисное окисление липидов и деструкцию убихинонов *Q9* и *Q10* при свободнорадикальном окислении ткани миокарда крысы.
2. Показаны антиоксидантные свойства нитрит аниона при свободнорадикальном окислении ткани миокарда крысы.
3. Впервые обнаружено, что соль Ангели, являющаяся донором нитроксильного аниона, ингибирует перекисное окисление липидов и деструкцию убихинонов *Q9* и *Q10* при свободнорадикальном окислении ткани миокарда.
4. Впервые показано, что уменьшение длительности ишемии сдвигает баланс некротической/апоптической гибели кардиомиоцитов в сторону последней, на ранних этапах реперфузии миокарда крысы.

#### **Научно-практическая значимость исследования**

Представленные в диссертации экспериментальные данные, проясняющие механизмы действия различных метаболитов оксида азота в условиях окислительного стресса, могут быть использованы для разработки фармакологических протекторных препаратов. Результаты диссертации могут быть также использованы для выяснения особенности действия уже используемых в медицинской практике доноров оксида азота, таких как нитроглицерин и его аналоги пролонгированного действия.

### **Апробация результатов исследования и публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в реферируемых научных журналах по списку ВАК.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на девяти всероссийских и международных конференциях, в том числе на XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам “Ломоносов-2005”, “Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии.” (Москва, 2005), IV и V национальной научно-практической конференции с международным участием “Активные формы кислорода, оксид азота антиоксиданты и здоровье человека” (Смоленск, 2005 и Смоленск 2007), VI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ (Москва, 2006), III съезде биофизиков России (Воронеж 2004), XIV и XV международной конференции и дискуссионном научном клубе “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” (Ялта-Гурзуф, 2006 и Ялта-Гурзуф, 2007).

### **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), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 125 страниц, включая 37 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 137 наименований.

### **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 описанию биохимических и биофизических особенностей развития ишемического и реперфузионного повреждения миокарда, запрограммированной клеточной гибели, активным формам кислорода, антиоксидантным системам клетки, донорам и метаболитам оксида азота. Описан каскад реакций апоптоза,



рассмотрены наиболее вероятные события, приводящие к индукции запрограммированной гибели клеток при ишемическом и реперфузионном стрессе. Обобщены и проанализированы современные экспериментальные данные по использованию ингибиторов каспаз в различных моделях ишемического/реперфузионного повреждения миокарда. Кратко изложены основные физико-химические свойства активных форм кислорода и азота, описаны их источники в биологических системах и взаимодействие с биологическими молекулами. Описана антиоксидантная система клетки, особое внимание уделено роли коэнзима Q в антиоксидантной защите. Обобщены и проанализированы экспериментальные данные по цитопротекторным и цитотоксическим свойствам доноров и метаболитов оксида азота. Обоснованы цель и задачи диссертационной работы.

**Во второй главе** представлены материалы и методы исследования.

В **разделе 2.1.** перечислены и описаны используемые в данной работе реактивы. **Раздел 2.2.** посвящен описанию моделирования региональной ишемии сердца крысы в условиях *in vivo*. Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Wistar. Крысы были наркотизированы внутривенно этиловым эфиром натрия, после чего им был имплантирован катетер в бедренную артерию для наблюдения АД и ЧСС, и в яремную вену для последующего добавления наркоза и окрашивания зоны риска. Животным производилась трахеостомия, после чего животные подключались к аппарату искусственной вентиляции легких. Региональная ишемия миокарда вызывалась перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия в условиях вскрытой грудной клетки. В **разделе 2.3.** описана методика проведения геля электрофореза ДНК кардиомиоцитов ткани миокарда после ишемии/реперфузии. **Раздел 2.4.** посвящен описанию методики синтеза S-нитрозотиолов и ДНКЖ. Концентрацию GSNO, CysNO и ДНКЖ определяли методом спектроскопии ЭПР. В **разделе 2.5.** описана методика свободнорадикального окисления гомогената миокарда крыс. Сердца крыс линии Wistar измельчались, смешивались с 40 mM Na,K-фосфатным буфером (pH 7.4) и гомогенизировались в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком до получения однородной массы. Окисление гомогената миокарда инициировали добавлением гидропероксида трет-бутила и метмиоглобина

или метгемоглобина. Перед окислением в гомогенат добавлялись различные концентрации PAPA/NONO, соли Ангели, GSNO, CysNO, NaNO<sub>2</sub> и ДНКЖ. **Раздел 2.6.** посвящен описанию методики определения ТБК-реактивных продуктов. Для определения концентрации ТБК-реактивных продуктов отбирались аликвоты гомогената миокарда (1мл), окисление в которых останавливалось добавлением ВНТ и ДТПА. Аликвоты препаратов миокарда добавлялись к 2 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,67% раствор ТБК, после чего смесь помещалась в водяную баню на 30 мин. После этого образцы охлаждались и центрифугировались. Измерение вторичных продуктов перекисного окисления (ТБК-реактивных продуктов) проводилось в надосадке по оптическому поглощению при 532 нм ( $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), в качестве базовой линии использовался отрезок спектра между 515-550 нм. В **разделе 2.7.** описана методика определения концентрации коэнзимов Q9 и Q10 в гомогенате ткани с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). **Раздел 2.8.** посвящен методике регистрации и обработки спектров ЭПР. Регистрацию спектров ДНКЖ проводили при комнатной температуре (~25°C) и температуре жидкого азота (-196°C). Аликвоты образцов гомогената (300 мкл) замораживали в жидком азоте, помещали в кварцевый дьюар в резонаторе спектрометра ЭПР, после чего записывали спектры при СВЧ мощности 10 мВт, СВ частоте 9,33 ГГц, амплитуде ВЧ модуляции 0,2 мТл. В **разделе 2.9.** описана методика получения изолированных митохондрии сердца крысы. **Раздел 2.10.** посвящен описанию экспериментов по изучению влияния аторвастатина и коэнзима Q на свободнорадикальную резистентность миокарда.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя приложения программы Origin 7.0 фирмы Microcal Software, Inc. (США). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

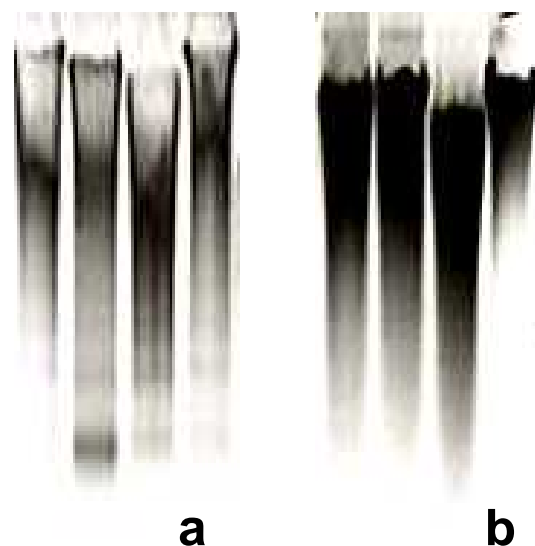
В **третьей главе** представлены непосредственно результаты исследований.

В **разделе 3.1.** приведены результаты исследования влияния ишемии различной длительности, на баланс запрограммированной (апоптоз) и некротической гибели кардиомиоцитов на модели региональной ишемии/реперфузии сердца крысы *in vivo*. Наркотизированные самцы крысы линии Wistar были подвергнуты 15-минутной или 25-минутной региональной

ишемии миокарда в условиях вскрытой грудной клетки и искусственной вентиляции легких. Баланс апоптической и некротической гибели клеток миокарда оценивали по присутствию на негативах геля электрофореза ДНК характерной для апоптоза «лесенки» и характерной для некроза размытой, диффузионной структуры. Как видно из рисунка 1а характерная для запрограммированной клеточной гибели «лесенка» ДНК наиболее четко проявилась в образцах миокарда после 15-минутной ишемии и последующей трехчасовой реперфузии. Действительно, работа специфической для апоптоза эндонуклеазы CAD приводит к разрезанию ДНК

апоптической клетки на фрагменты кратные 180 п.о. Диффузионный тип разрушения ДНК характерный для некроза проявляется в виде сплошной, размытой структуры при геле электрофорезе. Подобную структуру можно наблюдать в случае 25-минутной ишемии (рис. 1 б). Кроме того, в группе животных подвергшихся 15-минутной экспериментальной ишемии ДНК миокарда в целом была менее подвержена деградации. Следует отметить, что расщепление ДНК на фрагменты, кратные 180 п.о. является одним из наиболее поздних событий при апоптической гибели клетки. Формирование «лесенки» при геле электрофорезе ДНК из образцов миокарда свидетельствует о большом количестве клеток, дошедших до стадии расщепления ДНК, не подвергшихся при этом гибели по механизму некроза. Действительно, прохождение полного цикла реакций, характерных для апоптоза, требуют целостности клетки и определенного значения внутриклеточной концентрации АТФ.

Известно, что длительность ишемии влияет на образование АФК в ткани миокарда при последующей реперфузии. Было показано, что увеличение длительности ишемии приводит к значительному увеличению синтеза



**Рис. 1.** Гель электрофорез ДНК, выделенной из зоны риска миокарда крыс после 15-минутной (а) и 25-минутной экспериментальной ишемии (б). Реперфузия в обеих группах проходила в течение 3 часов.

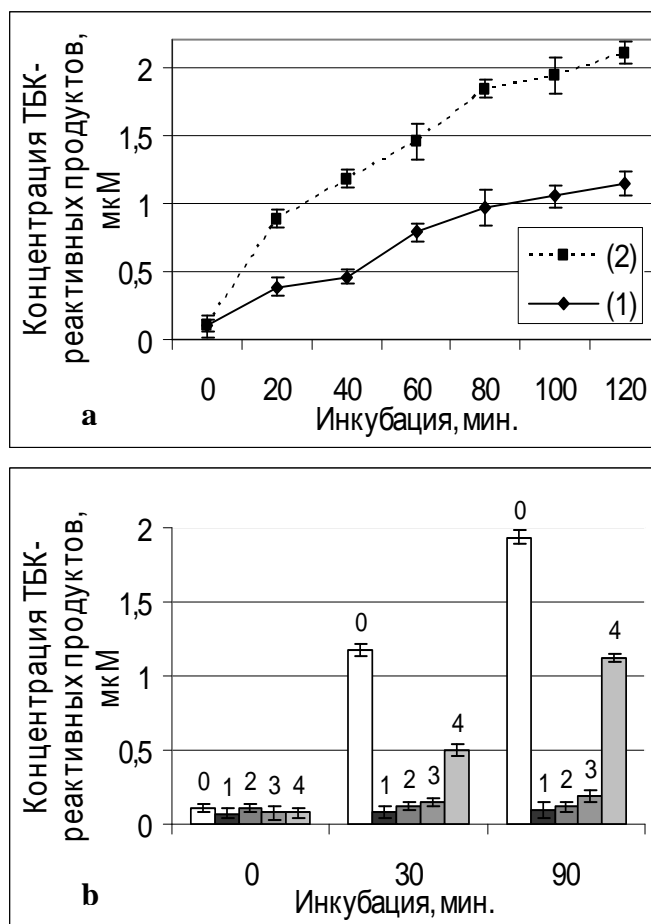
гидроксильно радикала в миокарде на модели региональной ишемии сердца крысы *in vivo*. Также показано, что увеличение длительности ишемии усиливает образование АФК митохондриями выделенными из миокарда.

Можно предположить, что после 15 мин. ишемии миокарда при последующей реперфузии происходит образование АФК, достаточное для активации запрограммированной клеточной гибели, при этом степень свободнорадикального

повреждения такова, что не происходит развитие процесса гибели клетки по механизму некроза. Таким образом, экспериментальная 15-минутная ишемия является вполне корректной моделью для

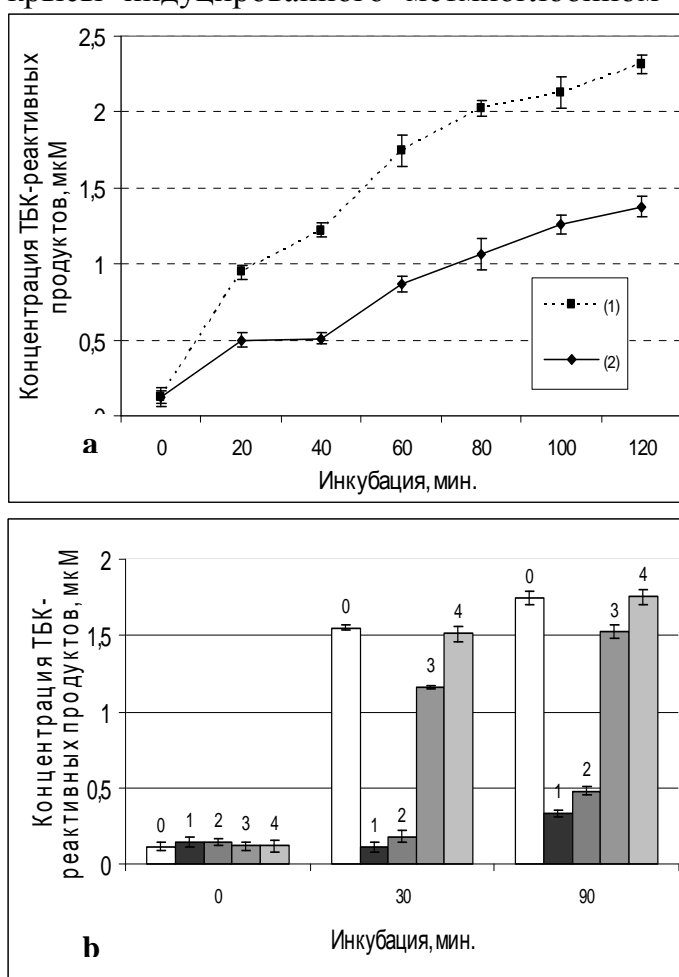
исследования апоптоза кардиомиоцитов на ранних этапах реперфузии при моделировании региональной ишемии сердца в условиях *in vivo*. Необходимо отметить, что полученные данные справедливы для использованной нами модели и могут отличаться в других моделях. Однако, можно предположить, что сдвигение баланса в сторону запрограммированной гибели клетки будет происходить и в других моделях при уменьшении длительности экспериментальной ишемии.

В разделе 3.2. представлены экспериментальные данные по изучению влияния синтетических доноров оксида азота и нитроксильного аниона на



**Рис. 2.** Ингибирование индуцированного гидропероксидом *трет*-бутила (40 мкМ) и метмиоглобином (30 мкМ) ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии различных концентраций PAPA/NONO. Рис. 2а, кривая (1) – концентрация PAPA/NONO равна 100 мкМ, кривая (2) – контроль. Рис. 2б: (0) – контроль; (1),(2),(3),(4) – PAPA/NONO в концентрации 800, 400, 200, 100 мкМ, соответственно.

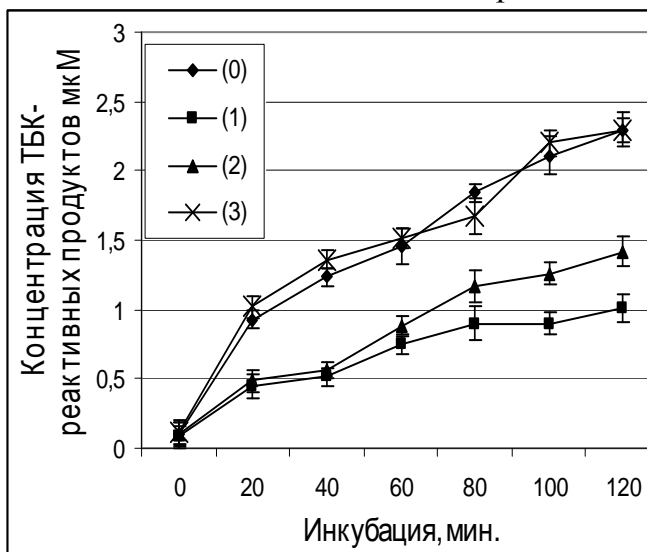
образование ТБК-реактивных продуктов в процессе свободнорадикального окисления гомогената миокарда крысы индуцированного метмиоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила. На рисунке 2 представлены кинетические кривые образование ТБК-реактивных продуктов в нашей системе. Как видно из рис. 2а, синтетический донор оксида азота PAPA/NONO эффективно дозозависимо ингибировал образование продуктов ПОЛ в нашей системе. Уже в концентрации 100 мкМ (рис. 2б) этот донор оксида азота значительно уменьшал образование ТБК-реактивных продуктов. Можно предположить, что ингибирование ПОЛ в использованной нами модельной системе обусловлено способностью оксида азота и его метаболитов взаимодействовать с пероксильными и алкоксильными радикалами липидов с образованием нитроперокси- и нитропроизводных. Известно, что в результате таких реакций обрываются цепные реакции свободнорадикального окисления. В ряде работ показано, что оксид азота может восстанавливать оксоферрил форму миоглобина (гем-Fe(IV)=O), образуя при взаимодействии метмиоглобина с гидроперексиями. Этот механизм также может вносить свой вклад в наблюдаемый нами антиоксидантный эффект PAPA/NONO.



**Рис. 3.** Ингибирование индуцированного гидропероксидом *трет*-бутила (40 мкМ) и метмиоглобином (30 мкМ) ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии различных концентраций соли Ангели (СА). Рис.3а – (1) контроль, (2) - СА 200 мкМ. Рис. 3б – (0) контроль, (1), (2) , (3), (4),- 800, 400, 200, 50 мкМ СА.

с пероксильными и алкоксильными радикалами липидов с образованием нитроперокси- и нитропроизводных. Известно, что в результате таких реакций обрываются цепные реакции свободнорадикального окисления. В ряде работ показано, что оксид азота может восстанавливать оксоферрил форму миоглобина (гем-Fe(IV)=O), образуя при взаимодействии метмиоглобина с гидроперексиями. Этот механизм также может вносить свой вклад в наблюдаемый нами антиоксидантный эффект PAPA/NONO.

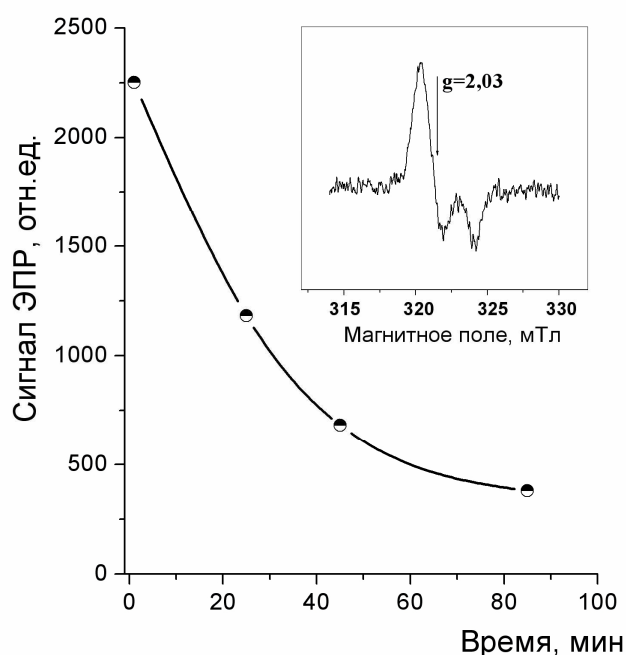
Соль Ангели ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ), являющаяся источником нитроксильного аниона, также дозозависимо ингибирует ПОЛ в гомогенате миокарда (рис.3). В настоящее время в литературе описано только цитотоксическое влияние соли Ангели в системах моделирующих ишемическое и свободнорадикальное повреждение органов и клеток. Предполагается, что в реакции между нитроксильным анионом и кислородом образуется пероксинитрит, проявляющий различные цитотоксические эффекты. Известно, что в реакции распада соли Ангели образуются эквимольные количества  $\text{NO}^-$  и нитрит аниона. Можно предположить, что нитрит анион способен оказать антиоксидантный эффект в нашей модели. Однако, в отличие от соли Ангели, оказавшей сильный антиоксидантный эффект в



**Рис. 4.** Кинетические кривые образования ТБК-реактивных продуктов при индуцированном метмиоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии различных концентраций связанных с декстраном ДНКЖ с цистеиновыми лигандами. (0) – без добавок, (1), (2), (3), - концентрации ДНКЖ равные 150, 100, 60 мкМ соответственно.

концентрации 200 мкМ, нитрит анион в этой же концентрации не оказал влияние на образование ТБК-реактивных продуктов. Полученные результаты позволяют предположить, что в гомогенате миокарда нитроксильный анион окисляется с образованием нейтральной молекулы  $\text{NO}$ , и соответственно, прооксидантный эффект нитроксильного аниона инвертируется в антиоксидантный. В разделе 3.3. представлены результаты исследования антиоксидантных и прооксидантных свойств физиологических доноров и метаболитов оксида азота. Представлены кинетические кривые образования ТБК-реактивных продуктов при индуцированном метмиоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии GSNO и CysNO. Оба нитрозотиола эффективно ингибируют перекисное окисление липидов в нашей системе. S-

нитроглютацион дозозависимо ингибирует ПОЛ, при этом максимальный антиоксидантный эффект наблюдается при наибольшей использованной концентрации GSNO равной 800 мкМ. Интересно, что при малых концентрациях (50-200 мкМ) GSNO не проявляет антиоксидантного эффекта. Показано, что в гомогенате миокарда, вследствие остаточной работы ферментов происходит образование супероксидного анион-радикала. При этом при инкубации гомогената миокарда без гидроперекиси трет-бутила не происходит образования ТБК-реактивных продуктов. Таким



образом, можно предположить, что образующийся в нашей системе в небольших количествах супероксидный анион-радикал эффективно удалялся собственной системой антиоксидантной защиты.

**Рис.5.** Кинетика деструкции связанных с декстраном цистеиновых ДНКЖ (100 мкМ) в ходе свободнорадикального перекисного окисления гомогената миокарда крысы индуцированного метмиоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила. На вставке приведен характерный спектр ЭПР ДНКЖ в замороженном при  $-196^{\circ}\text{C}$  гомогенате.

При этом в группах с GSNO происходила конкурентная реакция  $\text{NO}\cdot$  с  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , продуктом которой может быть пероксинитрит. Вероятно, именно образование пероксинитрита в наших экспериментах является причиной отсутствия антиоксидантного действия низких концентраций GSNO. Как и нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа являются внутриклеточными депо оксида азота. В нашей системе мы исследовали влияние ДНКЖ с цистеиновыми лигандами на образование ТБК-реактивных продуктов. На рисунке 4 представлены кинетические кривые образования ТБК-реактивных продуктов при индуцированном метмиоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии различных концентраций связанных с декстраном ДНКЖ с цистеиновыми лигандами. ДНКЖ проявили сильный антиоксидантный эффект. Уже в концентрации равной 150 мкМ данный реактив

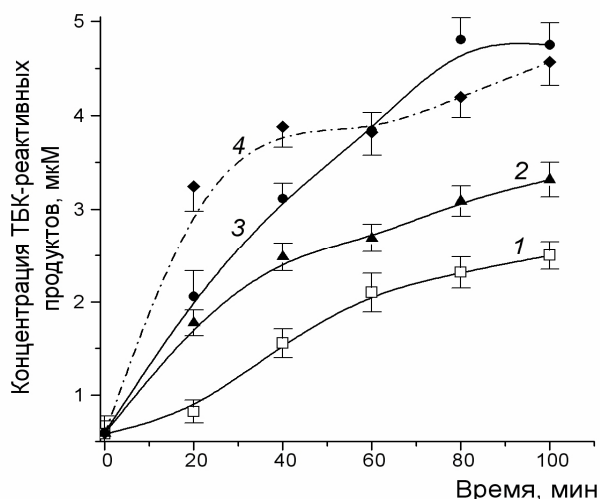
практически полностью ингибировал образование ТБК-реактивных продуктов в нашей системе. Можно предположить, что ингибирование ПОЛ в использованной нами модельной системе обусловлено способностью оксида азота высвобождающегося при деструкции ДНКЖ взаимодействовать с пероксильными и алкоксильными радикалами липидов с образованием нитроперокси- и нитропроизводных. С этим предположением согласуется то, что в используемой нами модели свободно-радикального окисления снижение ЭПР-детектируемой концентрации связанных с декстраном ДНКЖ коррелировало с их антиоксидантным действием (рис. 5).

В тоже время цистеиновые ДНКЖ без декстрана вызывают усиление ПОЛ в гомогенате миокарда (рис. 6, кривая 2). Обнаруженное противоречие в

действии разных типов динитрозильных комплексов железа, по-видимому, обусловлено высвобождением в ходе их деструкции ионов железа и цистеина, катализирующих перекисное окисление и реакции Фентона и Хабера-Вайса. Действительно свободный цистеин стимулировал индуцированное

миоглобином и гидропероксидом *трет*-бутила свободнорадикальное окисление гомогената миокарда (рис. 6, кривая 3), причем при добавлении избытка цистеина,

вместе с ДНКЖ их прооксидантное действие также возрастает (рис.6, кривая 4). Можно предположить, что постепенное поступление ДНКЖ из комплекса с декстраном обеспечивает постоянную концентрацию NO в ходе свободнорадикального окисления и тем самым преобладание антиоксидантного действия ДНКЖ над прооксидантным. Такой эффект может реализовываться в



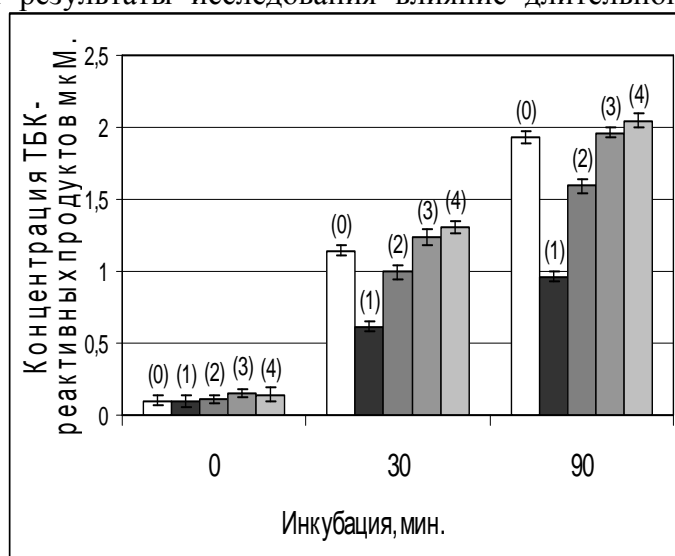
**Рис. 6.** Усиление образования ТБК-реактивных продуктов под действием 250 мкМ цистеиновых ДНКЖ (2), 2,5 мМ свободного цистеина (3) или сочетания 250 мкМ цистеиновых ДНКЖ и 2,5 мМ цистеина (4). Кривая (1) – без добавок.



условиях окислительного стресса благодаря усилению синтеза NO ферментативными системами, а также возможной регенерации ДНКЖ

Представлены данные по исследованию влияния различных концентраций нитрита натрия на образование ТБК-реактивных продуктов в процессе свободнорадикального окисления гомогената миокарда крысы. Нитрит натрия в концентрациях 400-800 мкМ значительно ингибировал образование ТБК-реактивных продуктов в нашей системе, что свидетельствует о его антиоксидантных свойствах (рис. 7). Представляется вероятным, что антиоксидантное действие нитрита натрия в нашей системе связано с восстановлением нитрит аниона до молекул NO.

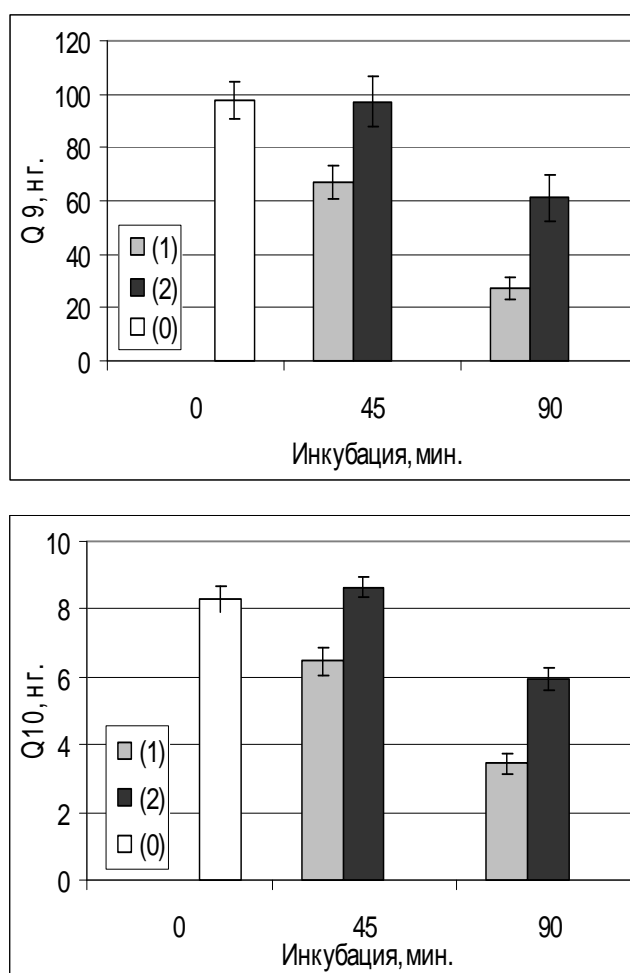
В разделе 3.4. представлены результаты исследования влияние длительного перорального введения водорастворимой формы убихинона Q10 и аторвастатина на резистентность гомогената миокарда к свободнорадикальному окислению индуцированному гидропероксидом трет-бутила и метмиоглобином. Образование ТБК-реактивных продуктов в гомогенате миокарда крыс было значительно снижено в группе животных получавших аторвастатин совместно с убихиноном Q10 по сравнению с группой животных получавших только аторвастатин. Известно, что длительная диета с увеличенной дозой коэнзима Q, повышает уровень этого кофермента в ткани миокарда и снижает образование АФК митохондриями сердечной мышцы. В тоже время, холестеринснижающие препараты из класса ингибиторов β-гидрокси-β-метилглутарил-коэнзим А-редуктазы (статины) подавляют не только синтез холестерина, но также и коэнзима Q. Данные свидетельствуют о важной роли коэнзима Q в защите сердечной мышцы от окислительного стресса. Приведены результаты исследования по изучению влияния доноров и метаболитов оксида азота на свободнорадикальную деструкцию



**Рис. 7.** Ингибирование индуцированного гидропероксидом трет-бутила (40 мкМ) и метмиоглобином (30 мкМ) ПОЛ гомогената миокарда крысы в присутствии различных концентраций NaNO<sub>2</sub>. (0) – без добавок NaNO<sub>2</sub>. (1), (2), (3), (4) – концентрации NaNO<sub>2</sub> соответственно равны 800, 400, 200, 50 мкМ.

убихинона в гомогенате миокарда крысы. Убихинон (у крыс представлен двумя формами  $Q_{10}$  и  $Q_9$ ) является одним из основных липофильных антиоксидантов, обладающих синергичным действием с другими антиоксидантными молекулами, а также важнейшим компонентом митохондриальной электрон-транспортной цепи. Одним из наиболее корректных методов оценки уровня окислительного стресса является определение содержания в биологических образцах эндогенных антиоксидантов.

Снижение концентрации эндогенных липофильных антиоксидантов характеризует первую наиболее близкую к физиологическим условиям стадию свободнорадикального окисления биологических липид-белковых комплексов. При изучении свободнорадикального перекисного окисления гомогената миокарда крыс мы оценивали изменение концентрации различных форм убихинона. Перекисное окисление инициировалось добавлением гидропероксида. Концентрацию убихинонов оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, отображающей динамику изменения суммарного, как окисленного, так и восстановленного пула этих антиоксидантов. Для исследования антиоксидантных и прооксидантных свойств доноров и метаболитов оксида азота в среду инкубации добавляли синтетический донор нитроксильного аниона соль Ангели, S-нитрозоглутатион, нитрит натрия, а



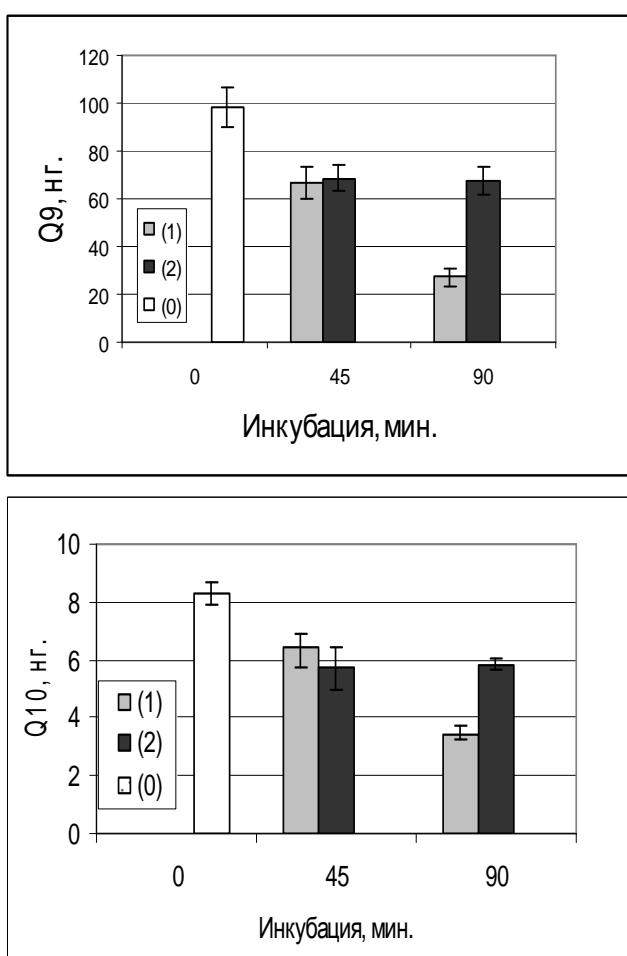
**Рис. 8.** Влияние соли Ангели (СА) в концентрации 600 мкМ (столбец (2)) на деструкцию убихинона  $Q_9$  и  $Q_{10}$  в ходе индуцированного гидропероксидом трет-бутила (1 мМ) окисления гомогената сердца крысы. Столбец (1) – без добавок СА. Столбец (0) – без инкубации и окисления.

также динитрозильные комплексы железа, ассоциированные с бычьим сывороточным альбумином.

В использованной нами модели наиболее сильный протекторный эффект наблюдался в группах с солью Ангели и S-нитрозоглутатионом. Так, соль Ангели в концентрации 600 мкМ почти на 60% снижала деструкцию убихинона Q9 и убихинона Q10 при 90-минутной инкубации, и на 35% при 45-минутной инкубации (рис. 8).

S-нитрозоглутатион в концентрации 600 мкМ почти не оказал протекторного действия при 45-минутной инкубации. При этом, при инкубации 90 мин. этот нитрозотиол демонстрировал наиболее сильный антиоксидантный эффект по сравнению с другими использованными донорами и метаболитами NO. Деструкция убихинона Q9 и Q10 была снижена на 70 и 60 процентов соответственно.

Ингибирование свободнорадикальной деструкции убихинонов Q9 и Q10 в гомогенате миокарда свидетельствует о сильном антиоксидантном эффекте данных доноров оксида азота и нитроксильного аниона. Можно предположить, что протекторный эффект используемых веществ, как и в случае ингибирования образования ТБК-реактивных продуктов, обусловлен взаимодействием оксида азота с алкоксильными и алкилпероксильными радикалами липидов, а также взаимодействием с редокс активным железом и



**Рис. 9.** Влияние динитрозильных комплексов железа связанных с бычьим сывороточным альбумином (DNIC-BSA) в концентрации 140 мкМ, столбец (2), на деструкцию убихинона Q9 и Q10 в ходе индуцированного гидропероксидом трет-бутила (1 мМ) окисления гомогената сердца крысы. Столбец (1) – без добавок DNIC-BSA. Столбец (0) – без инкубации и окисления.

восстановлением оксоферрил миоглобина. Можно предположить, что в нашей системе происходит окисление нитроксильного аниона до оксида азота под действием внутриклеточных ферментов или ионов металлов переменной валентности. Данный факт хорошо согласуется с тем, что данные доноры и метаболиты оксида азота эффективно подавляли образование ТБК-реактивных продуктов перекисного окисления липидов в использованной нами модели. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об антиоксидантных свойствах соли Ангели и S-нитрозоглютатиона при свободнорадикальном окислении гомогената миокарда крысы. Нитрит натрия также оказал протекторный эффект в нашей системе. Действительно, нитрит натрия в концентрации 600 мкМ почти на 50% ингибировал деструкцию убихинона *Q9* и на 30% убихинона *Q10* при 90-минутной инкубации. Как и в случае ингибирования нитритом натрия образования ТБК-реактивных продуктов в нашей системе, мы предполагаем, что в гомогенате миокарда происходит восстановление нитрит аниона до оксида азота при участии редокс-активных компонентов клетки.

Интересно, что как и в случае с S-нитрозоглютатионом динитрозильные комплексы железа связанные с бычьим сывороточным альбумином (DNIC-BSA) не оказав заметного эффекта при 45 минутной инкубации проявили заметные протекторные свойства при 90-минутной инкубации (рис. 9). Данные факты свидетельствуют о важной протекторной роли этих физиологических метаболитов NO и согласуются с тем, что наиболее эффективными антиоксидантами являются динитрозильные комплексы связанные с макромолекулами (например с декстраном).

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

## ВЫВОДЫ

1. Уменьшение длительности региональной ишемии сердца крысы *in vivo* приводит к смещению баланса между гибелью кардиомиоцитов по механизму некроза и апоптоза в сторону последнего.
2. Соль Ангели, являющаяся источником нитроксильного аниона и синтетический донор оксида азота PAPA/NONO эффективно ингибирует перекисное окисление липидов и деструкцию убихинонов Q9 и Q10 индуцированные гидропероксидом трет-бутила и метмиоглобином в гомогенате миокарда крысы.
3. Физиологические метаболиты NO - нитрит натрия, S-нитрозоглутатион и S-нитрозоцистеин эффективно ингибирует свободнорадикальное окисление гомогената миокарда крысы. S-нитрозоглутатион и нитрит натрия предотвращают деструкцию убихинона Q9 и Q10 в ходе перекисного окисления гомогената миокарда крысы.
4. Динитрозильные комплексы железа с цистеиновыми лигандами связанные с декстраном эффективно ингибируют свободнорадикальное окисление гомогената миокарда крысы.
5. Динитрозильные комплексы железа, ассоциированные с BSA, ингибируют деструкцию убихинона Q9 и Q10 в ходе перекисного окисления гомогената миокарда крысы.
6. Динитрозильные комплексы железа с цистеиновыми лигандами быстро разрушаются под действием АФК и при перекисном окислении гомогената миокарда крысы проявляют прооксидантный эффект.

**Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:**

1. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленикова Е.И., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Анитиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота// Биофизика, 2007, т. 52, №3, 503-509.
2. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Лакомкин В.Л., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие связанных с альбумином динитрозильных комплексов железа и активных форм кислорода// Биофизика, 2007, т. 52, №3, 534-538.
3. 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.
4. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К., Ланкин В.З. Возможные механизмы регенерации оксида азота из продуктов его взаимодействия с активными формами кислорода // XV Международная конференция и дискуссионный научный клуб. “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии.”. Ялта-Гурзуф. 31 мая - 9 июня 2007. Т. 9. С. 403-405.
5. Шумаев К.Б., Свиряева И.В., Кривова Т.С., Рууге Э.К., Гудков Л.Л., Ланкин В.З., Топунов А.Ф. Действие оксида азота на дыхательную цепь митохондрий сердца. 5-я национальная научно-практическая конференция с международным участием “Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека”. Смоленск. 18-22 сентября 2007. Сборник трудов. С. 197-199.
6. Рууге Э.К., Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свиряева И.В., Топунов А.Ф. Влияние ионов железа и железосодержащих белков на взаимодействие метаболитов оксида азота с активными формами кислорода. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 21-23 июня 2006). Сборник статей. Т. II. С.236-238.
7. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Губкина С.А., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Влияние синтетических доноров оксида азота и его

физиологических метаболитов на процессы свободно-радикального окисления в гомогенате миокарда крысы. VI Ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗЫ. Москва 24-27 ноября 2006. С. 46-48.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Гудков Л.Л., Александрюшкина Н.И., Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Шумаев К.Б. Роль апоптоза в ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда и формировании эффекта ишемического прекондиционирования. // III съезд биофизиков России. Воронеж, 24-29 сентября 2004. Сборник тезисов. С. 385-386.