

АЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ КАТЕХОЛОВ ДО ПАРАМАГНИТНОЙ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ, МЕХАНИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА МЕМБРАН И МАТРИКСА КЛЕТКИ ОТ ПЕРЕГРУЗКИ СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ И КАТИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

Лебедев А.В., Пугаченко И.С., Рууге Э.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения, Россия, г. Москва

Свободнорадикальная биология и медицина не будут достаточно полными, если рассматривать только газовую [1] и жидкую фазу клетки. Необходимо учитывать депонирование свободных радикалов в твердой фазе. Знания о химическом составе твердой фазы окисленных катехолов до сих пор весьма скудны из-за нерастворимости катехолов в воде и в обычных растворителях.

В норме, нерастворимые парамагнитные супрамолекулы катехолов - меланины обнаружены в коже, глазе, ухе, мозге, а при патологиях и во внутренних органах, например, в сердечно-сосудистой системе при развитии аритмий [2]. Естественным представляется наличие меланиновых островков внутри митохондрий [3], поскольку митохондрии являются одними из основных генераторов супероксида и богаты кальцием.

Аэробное окисление катехолов в слабо щелочном водном растворе в присутствии катионов щелочно-земельных металлов сопровождается поглощением кислорода и приводит к образованию устойчиво парамагнитного осадка темного цвета [4]. По темному цвету и спектру ЭПР этот осадок близок к природным меланинам. Время образования осадка снижается от нескольких десятков часов до нескольких секунд при добавлении в раствор генераторов свободных радикалов, например, супероксида натрия.

Предложенный нами метод получения устойчиво парамагнитных структур – синтетических меланинов - аэробным окислением катехолов показал, что двухвалентные катионы кальция играют центральную роль в спин-стабилизации свободных анион-радикалов супероксида и о-семихинонатов [4]. Это согласуется с более ранними работами по стабилизации катионами кальция о-семихинонатов [5, 6]. Добавление хелатора катионов ЭДТА приводит к растворению осадков и исчезновению устойчивых па-

рамагнитных свойств [4]. Из этого наблюдения мы сделали вывод, что полученные структуры являются супрамолекулами, а не ковалентно-связанными полимерами.

Во всех случаях появления пигментации свободные радикалы супероксида и катехолов локализуются (депонируются) на твердых поверхностях клеток и тканей, препятствуя избытку свободных радикалов в матриксе клетки и образуя защитный твердый слой на поврежденных мембранах в местах, где такой избыток образуется.

Круг исследований этих нерастворимых соединений вырос, когда было показано, что синтетический меланин – полидофамин – образует прочно связанные нанослои на различных твердых поверхностях, включая неорганические и органические материалы, в том числе благородные металлы, оксиды, полимеры, полупроводники и керамику [7], что позволило использовать эти твердофазные свободнорадикальные пленки во многих биомедицинских и нанотехнологических разработках.

Успешное применение эхинохрома в клинической практике при операциях на открытом сердце и дофамина при пересадке органов можно объяснить формированием твердофазных парамагнитных пленок и связыванием свободных радикалов. Особенностью действия эхинохрома является его долговременная эффективность в защите сердца от ишемии и реперфузии. В модели кальциевого парадокса (повреждении сердца при временной перфузии в бескальциевом растворе) [8], повышение концентрации кальция и кислорода приводит (с участием эхинохрома), как мы предполагаем, к образованию на поверхностных участках мембраны защитной водонерастворимой пленки супрамолекул, содержащих супероксид–кальций–о-семихинонат ($O_2^{\bullet-}-Ca^{2+}-Q^{\bullet-}$) [4]. Предполагаемое формирование слоев супрамолекул катехолов позволяет объяснить связь кальциевого парадокса и кислородного парадокса.

Нами был разработан метод количественной оценки полного пула гидрофобных редокс-активных соединений в клетках и плазме крови человека [9]. Измерения редокс-активных соединений в неполярных (н-гексановых) экстрактах до и после обработки сильным восстановителем $NaBH_4$ позволили получить количественную информацию о пулах, как восстановленных, так и окисленных ДФПГ-активных соединений. Сравнение количества витамина Е в эритроцитах и белых клетках крови человека, измеренного стандартным флуоресцентным методом, с полным пулом показало, что витамин Е составляет только 23-21% общего пула редокс ДФПГ-активных веществ. Таким образом, в клетках крови человека витамин Е не является единственным водо-нерастворимым антиоксидантом, как считалось ранее [10], но составляет небольшую часть всего

пула редокс-активных нерастворимых в воде веществ. Следовательно, 77-79% полного пулаДФПГ-активных соединений составляют нерастворимые в воде хиноидные соединения, которые необходимо учитывать при рассмотрении баланса свободных радикалов в биологических системах, представляющих собой комбинацию жидких и твердых соединений.

Логично предположить, что явление прекондиционирования также связано с образованием защитных слоев $O_2^{\bullet-}$ - Ca^{2+} - $Q^{\bullet-}$ на поврежденной поверхности тканей.

Литература

1. Pryor W.A., et al., Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, – 2006. – V. 291. – P. R491-R511.
2. Levin M.D., et al., Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *J Clin Invest*. – 2009. – V. 119. – P. 3420-36.
3. Daniele T., et al., Mitochondria and Melanosomes Establish Physical Contacts Modulated by Mfn2 and Involved in Organelle Biogenesis. *Cur Biol*. – 2014. – V. 24. – P. 393–403.
4. Лебедев А.В., с соавт., Парамагнитные кальциевые меланины. *Биофизика*. – 2013. – V. 58. – с. 47-53.
5. Kalyanaraman B. R.C. Sealy, Electron spin resonance--spin stabilization in enzymatic systems: detection of semiquinones produced during peroxidatic oxidation of catechols and catecholamines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982. – V. 106. – P. 1119-1125.
6. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Ruuge E.K. How do calcium ions induce free radical oxidation of hydroxy-1,4-naphthoquinone? Ca^{2+} stabilizes the naphthosemiquinone anion-radical of echinochrome A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2003. – V. 413. – P. 191-198.
7. Lee H., et al., Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*. – 2007. – V. 318. – P. 426-430.
8. Винокуров А.А. Действие антиоксиданта гистохром на сократительную функцию и метаболизм изолированного сердца крысы в условиях кальциевого парадокса, ишемии и реперфузии. *Вопросы медицинской химии*. – 2001. – №5. – с. 483-489.
9. Lebedev A.V., et al., A quantitative evaluation of redox-active compounds In human blood lipids. Hemoglobin. – 2011. – V. 35. – P. 247-254.
10. Burton G.W., Joyce A., Ingold K.U. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys*. – 1983. – V. 221. – P. 281-290.