

ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И СУПЕРОКСИД-РАДИКАЛ В КОМПЛЕКСАХ С ДИОКСОЛЕНАМИ И МЕЛАНИНАМИ

Лебедев А.В., Иванова М.В., Рууге Э.К.

*НИИ экспериментальной кардиологии, ФГБУ «Российский
кардиологический научно-производственный комплекс»
Минздравсоцразвития России, Москва, Россия, avleb@mail.ru*

Меланины – высокомолекулярные пигменты, образующиеся при ферментативном или автоокислении полифенолов. Меланины содержат стабильные *o*-семихиноновые мономеры, которые, вероятно, определяют его парамагнитные свойства. Другое характерное свойство меланинов – разнообразие ионов металлов их составе [1, 2]. Так, в гранулах нейромеланина мозга человека обнаружены рекордно высокие концентрации жизненно важных Fe, Zn, Ca, Cu, Mn, Co, и многих других металлов Se, Cd, Pb, Sb, Hg, Sc, Th, V, U, ... [1]. Защитные функции меланина связывают с хелатированием токсичных ионов металлов и с фотопротекцией. Неясным остается значение редокс-инертных Ca^{2+} , Zn^{2+} и т.д., в составе меланина [2] и роль их в синтезе меланиновых структур.

Диоксоленами называют соединения, содержащие катехолатные группы в 3 редокс-состояниях: дианион катехола Q^{2-} , моноанион *o*-семихинона $\text{Q}^{\bullet-}$ и *o*-бензохинон Q. Они образуют комплексы с катионами многих переходных металлов [3]. Редокс-инертные катионы M^{2+} (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+}) увеличивают время жизни *o*-семихинонов, образующихся при окислении диоксоленов O_2 или АФК – явление, названное «спин-стабилизацией» [4]. Связывание Ca^{2+} с *o*-дифенолами приводит к их депротонированию, уменьшению pK_i [5, 6]. При автоокислении M^{2+} , стабилизируя *o*-семихиноны, увеличивают скорость поглощения кислорода диоксоленами [5, 6]. Моделирование экспериментальных кинетических кривых многостадийной схемой реакций автоокисления пирокатехина позволило рассчитать константы скоростей элементарных реакций с и без $[\text{Ca}^{2+}]$ [7]. Расчет привел к выводу, что Ca^{2+} заметно меняет константы скоростей двух реакций – диспропорционирования (k_d) *o*-семихинонов $2\text{Q}^{\bullet-} \rightarrow \text{Q}^{2-} + \text{Q}$ и компропорционирования (k_c) катехолата и хинона $\text{Q}^{2-} + \text{Q} \rightarrow 2\text{Q}^{\bullet-}$. Так, образование Ca^{2+} -диоксоленового комплекса уменьшает константу k_d с $14 \cdot 10^6$ до $0,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, и, наоборот, увеличивает k_c от 1 до $480 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ в присутствии 10 мМ CaCl_2 и 1 мМ пирокатехина [7]. Результирующий рост концентрации более стабильных радикалов $\text{Ca}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$ приводит к разветвлению цепи окисления, что и объясняет наблюдаемый

Ca^{2+} -зависимый рост скорости поглощения кислорода. Реакции диоксенов с кислородом и Ca^{2+} в водном растворе предшествуют последующей полимеризации с образованием не растворимых парамагнитных «кальциевых меланинов».

При окислении катехолат-содержащих соединений (пирокатехина, пирогаллола, ДОФА, дофамина, норадреналина и эхинохром) кислородом воздуха в Ca^{2+} -содержащем щелочном буферном растворе процесс образования кальциевых меланинов занимает несколько суток. Однако, тот же процесс сокращается до нескольких секунд, когда для окисления использовали супероксид калия (KO_2). В контрольных экспериментах действие KO_2 на катехолаты без Ca^{2+} не приводит к образованию парамагнитного осадка. Спектры ЭПР полученных кальциевых меланинов по форме, ширине линии и g фактору ($\sim 2,004$) мало отличаются друг от друга, а также от спектров ЭПР других синтетических и природных меланинов. Парамагнитные свойства кальциевых меланинов сохраняются в течение многих месяцев. Однако, добавка хелатора Ca^{2+} , EDTA, приводит к растворению кальциевых меланинов в воде и к исчезновению сигнала ЭПР.

Представленные результаты показывают, что Ca^{2+} может играть структурообразующую роль в формировании долгоживущих парамагнитных центров меланино-подобного полимера, образующихся при окислении пирокатехина, пирогаллола, ДОФА, дофамина, норадреналина и эхинохрома супероксид-радикалом. Спектры ЭПР всех кальциевых меланинов близки друг к другу и к не связанному *o*-семихинону ($g \sim 2,0043$). Основой центров с неспаренными электронами в меланине, определяющих их устойчивый парамагнетизм, могут быть радикалы двух типов: (1) M^{2+} -стабилизированный анион-радикал *o*-семихинона ($\text{M}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$) и (2) бирадикальный комплекс анионов *o*-семихинона и супероксида, стабилизированный Ca^{2+} или другим двухвалентным редокс-инертным катионом металла M^{2+} ($\text{O}_2^{\bullet-}\text{-M}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$). Соотношение между ($\text{M}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$) и ($\text{O}_2^{\bullet-}\text{-M}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$) зависит от концентраций O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$, как показано в ряде работ, в которых изучали действие кислорода и супероксида на парамагнитные характеристики меланинов [8, 9]. Установленная недавно [10] положительная корреляция между мольной долей кислорода и мольной долей кальция в составе молекул меланина и в составе меланочитов, согласуется с гипотезой, предполагающей формирования устойчивых $\text{O}_2^{\bullet-}\text{-Ca}^{2+}\text{-Q}^{\bullet-}$ структур.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 10-04-00869).

Литература

1. Zecca L., Tampellini D., Costi P., Rizzio E., Giaveri G., Gallorini M. Combined biochemical separation and INAA for the determination of iron and other metals in Neuromelanin of human brain Substantia Nigra // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. – 2001. – Vol. 249, N 2. – P.449–454.
2. Hong L., Simon J.D. Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin // *J Phys Chem B*. – 2007. – Vol. 111, N 28. – P.7938-47.
3. Griffith W.P. Recent advances in dioxolene chemistry // *Transition Met. Chem*. – 1993. – Vol. 18. – P.250-256.
4. Kalyanaraman B. Sealy R.C. Electron spin resonance--spin stabilization in enzymatic systems: detection of semiquinones produced during peroxidatic oxidation of catechols and catecholamines // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1982. – Vol. 106, N 4. – P.1119-1125.
5. 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. – Vol. 413, N 2. – P.191-198.
6. Lebedev A.V., Иванова М.В., Timoshin A.A., Рууге Э.К. Effect of group II metal cations on catecholate oxidation // *Chemphyschem*. – 2007. – Vol. 8, N 12. – P.1863-1869.
7. Лебедев А.В., Иванова М.В., Рууге Э.К., Кальций-диоксоленовые комплексы: константы скоростей реакций окисления пирокатехина в присутствии Ca^{2+} // *Биофизика*. – 2011. – Vol. 56, №2. – P.205-211.
8. Pilawa B., Latocha M., Buszman, E. Wilczok, T. Effect of oxygen on spin-spin and spin-lattice relaxation in DOPA-melanin. Complexes with chloroquine and metal ions // *Appl Magnet Resonance*. – 2003. – Vol. 25. – P.105-111.
9. Korytowski W., Kalyanaraman B., Menon, I.A., Sarna, T., Sealy, R.C. // Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim.Biophys Acta*. – 1986. – Vol. 882, N 2. – P.145-153.
10. Biesemeier A., Schraermeyer U., Eibl O. Chemical composition of melanosomes, lipofuscin and melanolipofuscin granules of human RPE tissues // *Experimental Eye Research*. – 2011. – Vol. 93. – P.29-39.