

**КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ**

**РЕГИСТРАЦИЯ СУПЕРОКСИДА, ОКСИДА АЗОТА  
И МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ  
ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

Учебно-методическое пособие

**КАЗАНЬ**  
**Центр инновационных технологий**  
**2017**

**УДК 537.635.07:577.334(075.8)**

**ББК 22.334с.я73**

**С78**

*Утверждено учебно-методической комиссией  
института физики Казанского федерального университета  
Протокол № 6 от 17 апреля 2017 г.,  
Протокол № 8 заседания кафедры медицинской физики от 30 марта  
2017 г.*

**Рецензенты:**

д.х.н., профессор А.В. Аганов

д.х.н., с.н.с. М.К. Кадиров

**Регистрация** супероксида, оксида азота и медьсодержащих соединений методами электронного парамагнитного резонанса [Текст]: учебно-методическое пособие / Г.В. Мамин, Р.В. Юсупов, С.Б. Орлинский, М.Р. Гафуров, Ю.А. Челышев. – Казань: Центр инновационных технологий, 2017. – 48 с.

В учебно-методическом пособии рассматриваются теоретические и практические аспекты метода спиновых ловушек, используемых для детектирования и количественного анализа супероксидных, азотных и медьсодержащих радикалов в медицинских и биологических исследованиях техниками стационарного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Пособие предназначено для подготовки магистров направлений «медицинская физика» и физика магнитных явлений.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. МЕТОД СПИНОВЫХ ЛОВУШЕК .....	5
1.1. Общие принципы .....	5
1.2. Типы спиновых ловушек .....	7
2. СУПЕРОКСИДНЫЕ РАДИКАЛЫ .....	14
3. ОКСИД АЗОТА .....	20
3.1. Значение оксида азота в биологических системах ..	20
3.2. Оксид азота при повреждении биологической тка- ни .....	21
3.3. Методы регистрации и химические особенности NO .....	23
4. КОМПЛЕКСЫ МЕДИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕ- МАХ .....	27
4.1. Cu, Zn-супероксиддисмутаза .....	28
4.2. Регистрация комплекса CuII(ДЭТК)2 .....	29
5. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ FE-ДТК В КАЧЕ- СТВЕ СПИНОВОЙ ЛОВУШКИ ДЛЯ NO .....	30
5.1. Дитиокарбаматы в качестве спиновых ловушек ...	30
5.2. Реакционная способность комплексов Fe-ДТК по отношению к NO и стабильность комплексов с NO .....	34
6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ NO И CU(II) В НЕРВНОЙ ТКАНИ .....	39
6.1. Приготовление спиновых ловушек .....	39
6.2. Спектры ЭПР CuII(ДЭТК)2 и FeII(NO)(ДЭТК)2 ....	40
6.3. Методика определения концентраций CuII(ДЭТК)2 и FeII(NO)(ДЭТК) .....	42
7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ .....	44
Литература .....	45

## ВВЕДЕНИЕ

Во многих биологических системах важную роль играют свободные радикалы. Концентрация этих комплексов обычно невелика, однако они обладают высокой реакционной способностью. Поэтому для изучения свободных радикалов следует использовать методы, имеющие высокую чувствительность и обладающие способностью детектировать нестабильные молекулы. Кроме того, в случае биологических систем важно иметь возможность проводить измерения *in vivo* и в режиме реального времени. Таким требованиям отвечает метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием так называемых *спиновых ловушек*. Последние являются химическими соединениями, образующими с короткоживущими парамагнитными центрами стабильные комплексы, детектируемые в дальнейшем по спектрам ЭПР.

Близким по идеологии является метод *спиновых меток*, когда в исследуемую систему в качестве спиновых зондов вводят парамагнитные молекулы, от которых наблюдаются характерные сигналы ЭПР.

Исследования методом ЭПР центров, образующихся при введении в изучаемые системы спиновых ловушек или спиновых меток, дают информацию о структурных характеристиках, подвижности молекул и динамике различных процессов во многих физико-химических, биологических и медицинских объектах.

В настоящем учебно-методическом пособии рассматривается использование спиновых ловушек для определения концентраций супероксидных радикалов, оксида азота и двухвалентной меди  $\text{Cu(II)}$  – объектов, чрезвычайно важных в биологии и медицине. Практическое задание предусматривает применение метода спиновых ловушек для определения концентраций супероксида, оксида азота и медьсодержащих комплексов в нервной ткани. Пособие предназначено для подготовки магистров направлений «медицинская физика» и «физика магнитных явлений».

# 1. МЕТОД СПИНОВЫХ ЛОВУШЕК

## 1.1. Общие принципы

Спиновые ловушки – это химические вещества, способные реагировать с короткоживущими радикалами, образуя при этом стабильные парамагнитные соединения – спиновые аддукты. Спиновые ловушки применяются для изучения различных процессов, протекающих с участием свободных радикалов. Присутствие спиновых аддуктов в исследуемых системах легко детектируется методом ЭПР. Спектры ЭПР образующихся спиновых аддуктов несут информацию о строении генерируемых в системе свободных радикалов и позволяют получать данные о кинетике и механизмах протекающих здесь свободнорадикальных реакций [1].

В качестве спиновых ловушек используют органические компоненты, нитроны и нитрозосоединения, в концентрациях, достаточных для реакции с изучаемым радикалом. В случае нитронов и нитрозосоединений продукты реакции относятся к нитроксильным радикалам (рисунок 1.1) [2].

В качестве спиновых ловушек используются и другие соединения, хотя и в меньшей степени. Не так давно под термином «спиновые ловушки» стали понимать также ряд структур, включающих в себя комплексы ионов металлов и гемопротеинов. При использовании спиновых ловушек в эксперименте регистрируется не исходный радикал, а его аддукт, т.е. продукт реакции спиновой ловушки и радикала. Проведение прямых измерений всегда является предпочтительным, однако часто данный метод является *единственной* возможностью регистрации короткоживущих нестабильных радикалов.

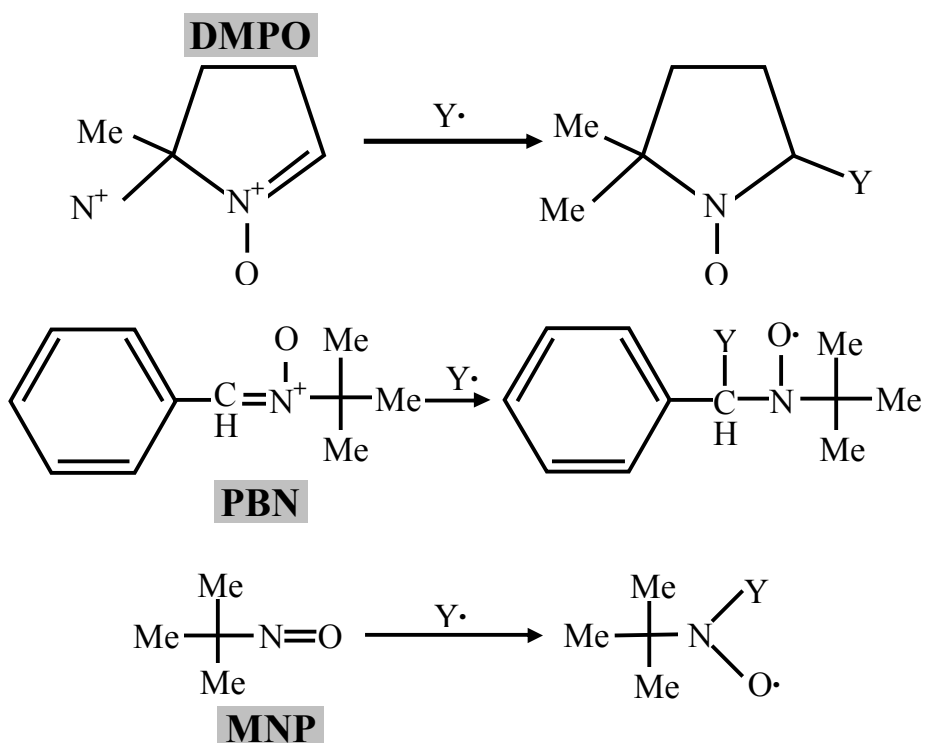


Рис. 1.1. Схема образования аддуктов некоторых спиновых ловушек: 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида (DMPO), N-*tert*-бутил- $\alpha$ -фенилнитрона (PBN), 2-нитро-2-метилпропана (MNP)

Важнейшей задачей в исследованиях, выполняемых методом ЭПР с использованием спиновых ловушек, является идентификация исследуемого соединения и механизма его образования, поскольку ошибки на этом этапе могут привести к некорректной интерпретации полученной информации. Так, известно достаточно много механизмов образования спиновых аддуктов, не отраженных в прямых реакциях исследуемого радикала со спиновой ловушкой, представленных на рисунке 1.1. Некоторые из этих процессов интересны с практической точки зрения, но могут затруднить проведение эксперимента. Поэтому существует ряд ключевых вопросов, на которые необходимо ответить для корректной регистрации и интерпретации спектров ЭПР, получаемых с использованием спиновых ловушек:

- 1) Существуют ли альтернативные пути взаимодействия исследуемых радикалов с данной спиновой ловушкой?

2) Согласуются ли концентрация и природа получаемого соединения с изучаемым процессом?

3) Является ли процесс, приводящий к образованию спинового аддукта, основной реакцией, или же только второстепенной? Этот вопрос становится все более важным в связи с ростом чувствительности современных спектрометров ЭПР. Так, сегодня можно получить уверенный сигнал ЭПР от радикалов с концентрацией несколько десятков мкМ (мкмоль/литр; обратите внимание на использование заглавной М в научной литературе и данном пособии для обозначения единиц измерения концентрации).

4) Является ли используемая спиновая ловушка наиболее оптимальной и информативной в данном эксперименте?

5) Не нарушает ли спиновая ловушка изучаемый процесс так, что концентрация спинового аддукта становится отличной от первоначальной концентрации радикала?

Хотя изложенные вопросы во многом усложняют фазу подготовки к проведению эксперимента, однако знание ответов на них делает полученные результаты намного более ценными.

## 1.2. Типы спиновых ловушек

Идеальная спиновая ловушка должна удовлетворять следующим требованиям:

- быстро реагировать с широким рядом радикалов;
- в результате реакции образовывать стабильные аддукты;
- обладать устойчивостью по отношению к освещению, повышенной температуре, а также к воздействию различных химических и биохимических компонентов, включая ферменты;
- образовывать аддукты, которые с легкостью поддаются экстракции, сепарации и полному описанию;
- легко синтезироваться в чистом виде, а также в формах, включающих изотопы;
- быть нетоксичными и физиологически инертными.

Ни одна из существующих спиновых ловушек не обладает всеми вышеперечисленными качествами, поэтому выбор определяется каждой конкретной ситуацией.

Для упрощения выбора существует следующая классификация спиновых ловушек:

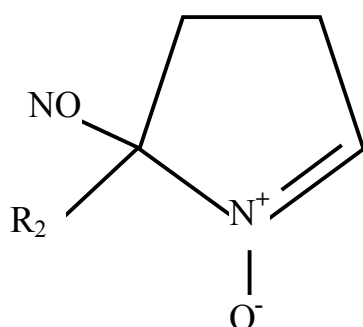
- соединения, родственные циклическому нитрону 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксиду (DMPO)
- соединения, родственные ациклическому нитрону N-трет-бутил- $\alpha$ -фенилнитрону (PBN)
- нитрозосоединения (типа MNP).

### 1.2.1.

Цик

лические нитронные спиновые ловушки

Наибольший прогресс в разработке спиновых ловушек связан в последние годы с циклическими нитронными ловушками. Структура некоторых из них представлена на рисунке 1.2, а регистрируемые спектры ЭПР аддуктов с использованием некоторых из модификаций DMPO приведены на рисунке 1.3.



$R_1=Me, R_2=P(O)(OEt)_2$ ;

DEPMPO

$R_1=Me, R_2=CO_2Et$ ; EMPO

$R_1=Me, R_2=CO_2Bu$ ; BMPO

$R_1=R_2=Me$ ; DMPO

Рис. 1.2. Структура простейших циклических нитронных спиновых ловушек



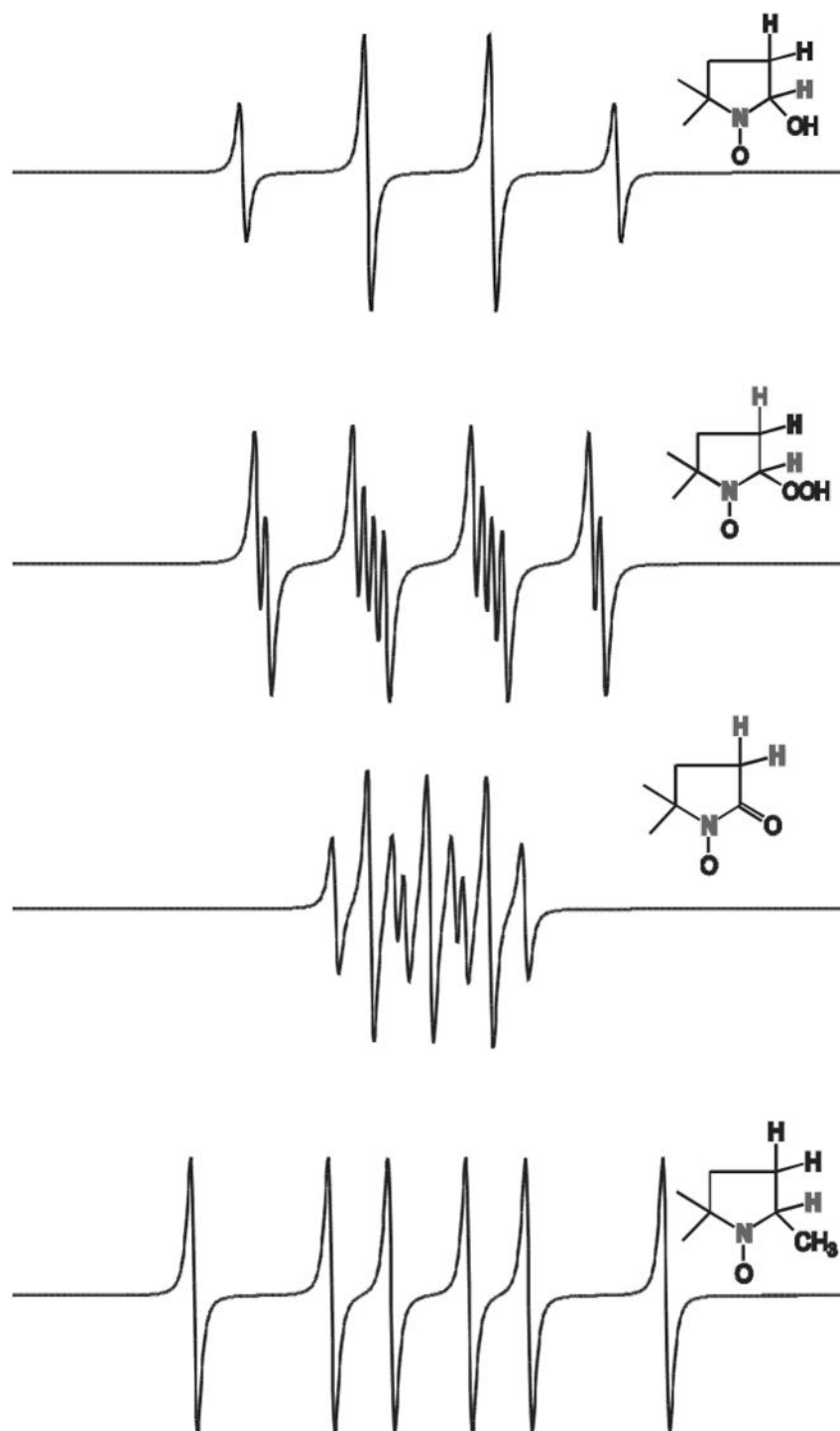


Рис. 1.3. Виды спектров ЭПР аддуктов для некоторых различных спиновых ловушек DMPO

Для ключевых биологических радикалов, таких, как супероксид радикал  $O_2^-$ , новые ловушки, например, ДЕРМО, ЕМО и ВМО, имеют явные преимущества перед традиционно используемыми в подобных случаях ловушками типа ДМО, особенно в отношении их стабильности. Однако необходимо отметить, что при использовании некоторых из новых ловушек также возникают проблемы. Так, многие из них не синтезируются в промышленных масштабах, поэтому их приобретение зачастую оказывается затрудненным или даже невозможным. Кроме того, иногда недостает литературных данных, позволяющих корректно интерпретировать получаемые спектры ЭПР.

### 1.2.2. Ациклические нитронные спиновые ловушки

Количество ациклических (молекулы которых не содержат циклов, а представляют собой «открытые» цепи) нитронных спиновых ловушек, синтезированных в последние годы, невелико по сравнению с описанными выше циклическими. Примеры простейших спиновых ловушек из этого ряда представлены на рисунке 1.4, а спектры ЭПР для аддуктов некоторых из них – на рисунке 1.5.

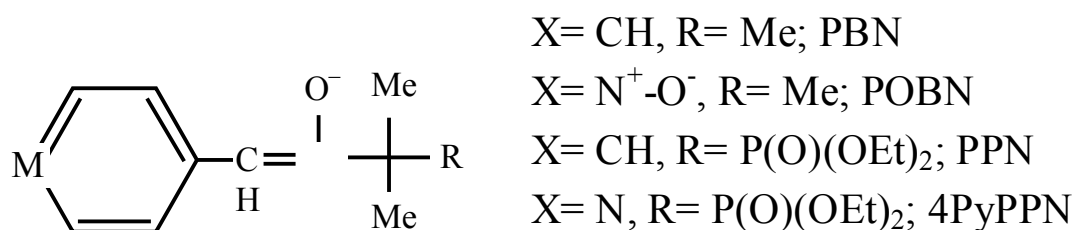


Рис. 1.4. Структура простейших ациклических нитронных спиновых ловушек

Эти ловушки менее информативны, чем циклические нитроны, и потому имеют ограниченные возможности для идентификации ради-

кальных аддуктов. Главным преимуществом этих ловушек является высокая устойчивость их аддуктов. Данное свойство особенно важно для понимания, является ли изучаемый процесс радикалопосредованным или же нет до того, как будет проведено его более детальное изучение. Эта устойчивость также очень важна при попытке разделения и последующего изучения аддуктов с помощью таких методов, как масс-спектрометрия или электрохимический анализ. Большинство успешных исследований в данной области проведено с использованием именно ациклических нитронов. К тому же, большую часть спиновых ловушек этого класса легко приобрести или синтезировать в чистом виде в больших объемах.

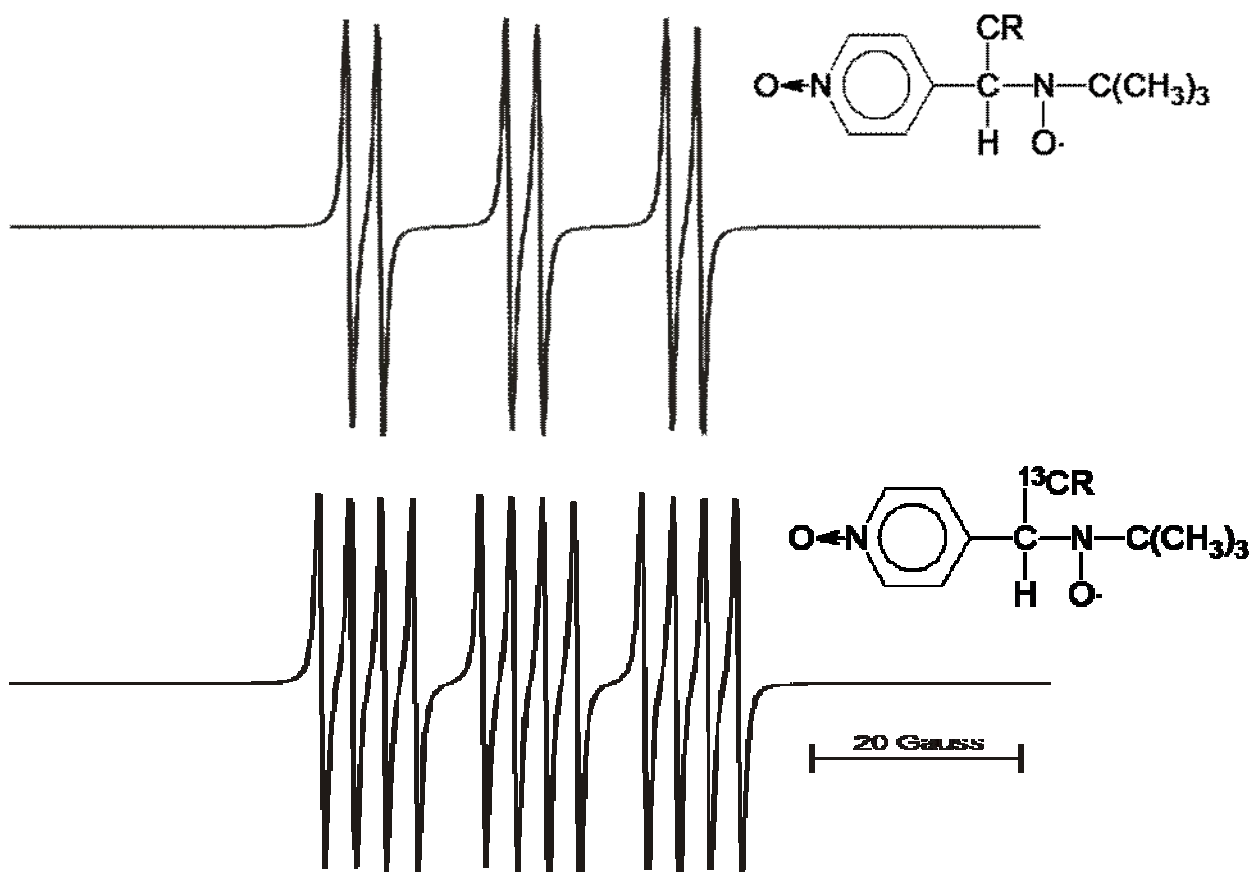


Рис. 1.5. Виды спектров ЭПР аддуктов для некоторых различных спиновых ловушек PBN

### 1.2.3. Нитрозильные спиновые ловушки

Число нитрозосоединений, синтезированных для использования в качестве спиновых ловушек в последнее время, уступает даже числу ациклических нитронных ловушек. Фактически используется DBNBS (Dibromo-nitrosobenzenesulfonic acid, рисунок 1.6). Типичные спектры ЭПР при захвате нитрозильными спиновыми ловушками метильного радикала  $\bullet\text{CH}_3$  представлены на рисунке 1.7.

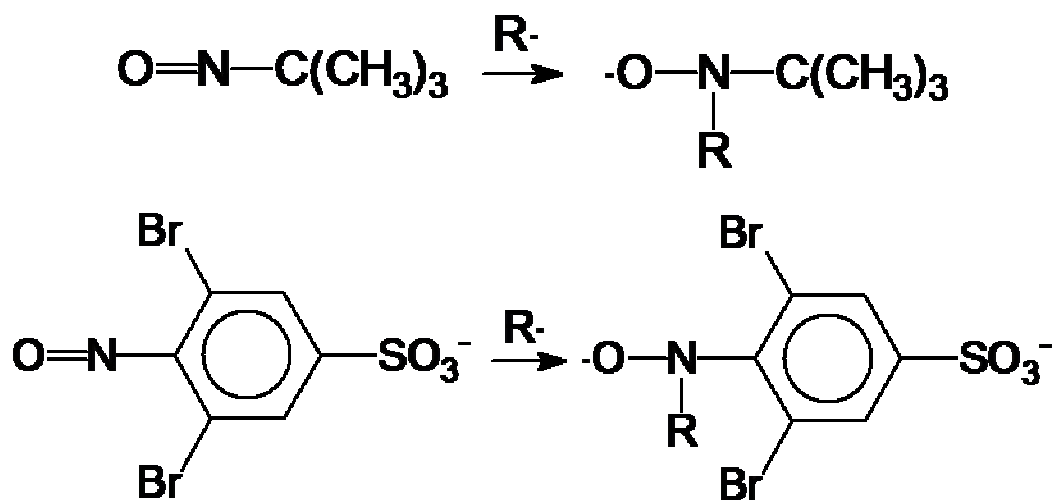
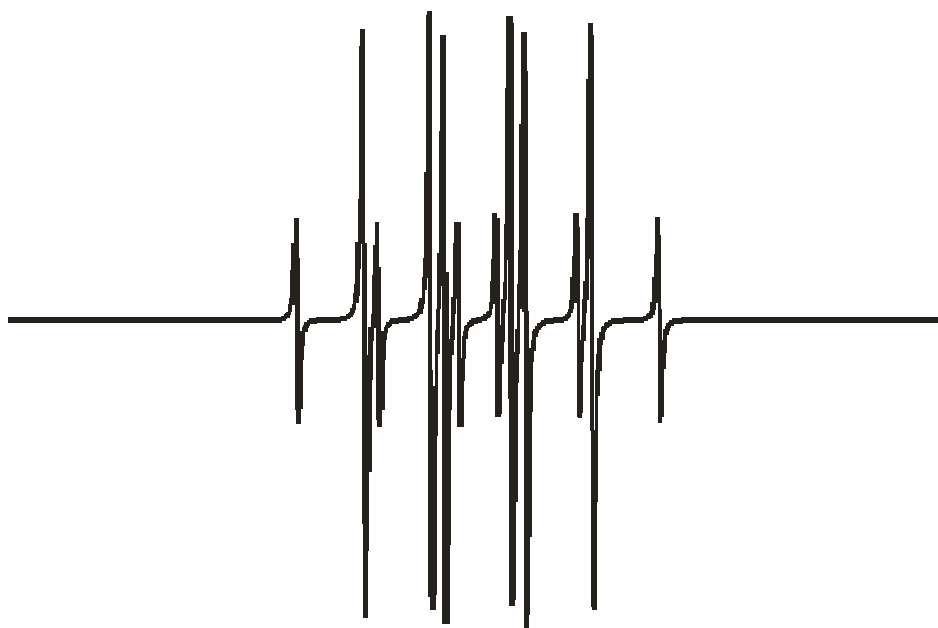


Рис. 1.6. Вверху – структура и схема захвата радикала ловушкой MNP. Внизу – структура и схема захвата радикала ловушкой DBNBS

Отметим также, что синтезируются нитрозоловушки, меченые дейтерием ( $^2\text{H}$ ), изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ .

MNP/<sup>•</sup>CH<sub>3</sub>,  $a^N = 17.2 \text{ G}$ ;  $a^H = 14.2 \text{ G}$  (3H)



DBNBS/<sup>•</sup>CH<sub>3</sub>,  $a^N = 14.3 \text{ G}$ ;  $a^H = 13.3 \text{ G}$  (3H)

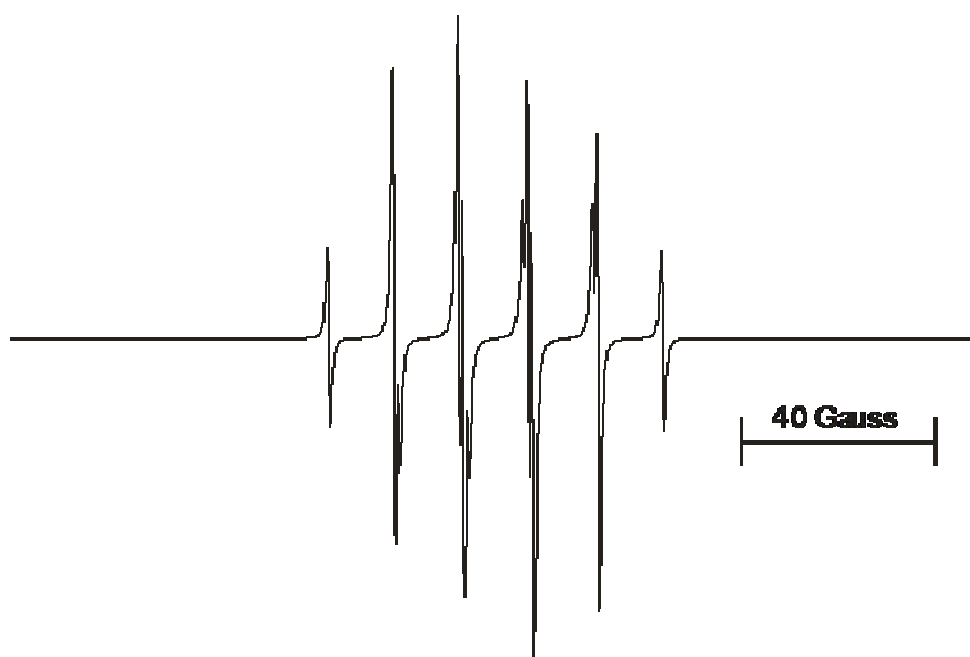


Рис. 1.7. Типичные спектры ЭПР при захвате радикала  $\bullet\text{CH}_3$  нитрозильной ловушкой MNP (вверху) и DBNBS (внизу)

## 2. СУПЕРОКСИДНЫЕ РАДИКАЛЫ

В основном состоянии молекулярный кислород представляет собой относительно стабильную молекулу, спонтанно не реагирующую с различными макромолекулами. Это объясняется его электронной конфигурацией: основная форма кислорода в атмосфере ( $^3\text{O}_2$ ) находится в триплетном состоянии. Однако аэробные организмы сталкиваются с постоянной опасностью, связанной с тем, что многие процессы с участием молекулярного кислорода сопровождаются образованием так называемых активных форм кислорода, (АФК, ROS - Reactive Oxygen Species), обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью. В настоящее время к числу АФК относят производные кислорода радикальной природы (супероксид-радикал (анион-радикал)  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , гидроперекисный радикал  $\text{HO}_2^{\cdot}$ , гидроксил-радикал  $\text{HO}^{\cdot}$ ), а также его реактивные производные (перекись водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ , синглетный кислород  $^1\text{O}_2$  и пероксинитрит).

Ключевой активной формой кислорода является супероксид анион – радикал ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), образующийся при присоединении одного электрона к молекуле кислорода в основном состоянии. Супероксид радикал сам по себе обладает малой реакционной способностью и в водной среде может спонтанно дисмутировать. Время его жизни в биологических субстратах составляет около  $10^{-6}$  с. Супероксид анион-радикал представляет опасность тем, что способен повреждать белки, содержащие железо-серные кластеры, такие как аконитаза, сукцинат-дегидрогеназа и НАДН-убихинон оксидоредуктаза. В кислой среде ( $\text{pH} < 7$ ) супероксид анион-радикал протонируется с образованием более реакционно-способного пероксильного радикала. Присоединение двух электронов к молекуле кислорода или одного электрона к супероксид-аниону приводит к образованию пероксида водорода, который является окислителем умеренной силы.

Супероксидные радикалы могут вызывать широкий спектр ответных реакций клеток, что зависит от скорости их генерирования,

продолжительности воздействия, локализации и характера метаболитов, которые могут образовываться. Низкий уровень супероксидных радикалов вызывает митогенный эффект, инициирует клеточную пролиферацию и поддерживает выживание клеток, в то же время промежуточные уровни вызывают кратковременную или полную остановку клеточного цикла и индукцию дифференцировки клеток. При высоких уровнях скорости генерирования супероксидные радикалы могут легко вступать в реакцию с мембранными липидами, вызывая изменение проницаемости мембран, окислительно-индуцированную нестабильность функционирования генома вследствие его окислительной модификации, и окислительную модификацию белков, в результате чего изменяется или теряется каталитическая активность ферментов, либо меняется чувствительность белков к протеолитической деградации. В этом случае супероксидные радикалы инициируют апоптоз клеток или некроз. С другой стороны, когда уровень генерирования радикалов кислорода таков, что необратимо меняется жизнедеятельность клеток, они могут выступать в качестве основного мессенджера, модулируя некоторые внутриклеточные сигнальные каскады, что приводит к прогрессированию рака. Так, существуют некоторые данные о том, что супероксидные радикалы через воздействие на внутриклеточные сигнальные пути влияют на деструкцию внеклеточного матрикса, что опосредуется через изменение активности протеолитических ферментов.

Обычно методами ЭПР проводят анализ скорости генерирования супероксидного радикала. Продемонстрируем это на примере нашего исследования - изучения взаимодействия опухолевых и стромальных клеток. Это взаимодействие является решающим фактором в опухолевой прогрессии. Активация в клетках стромы (эндотелиальных клетках, фибробластах, миофибробластах, нейтрофилах, макрофагах) систем генерирования супероксидных радикалов является процессом, необходимым для инвазии и метастазирования.

Считается, что одним из основных источников генерирования супероксидных радикалов являются митохондрии. Характерной

функцией митохондрий является синтез аденозинтрифосфата (АТФ) при окислительном фосфорилировании. В процессе гликолиза также синтезируется АТФ, обеспечивая компенсаторный механизм в условиях, когда окислительное фосфорилирование становится неэффективным вследствие дефектов дыхательной цепи.

Электроны, перемещаясь по дыхательной цепи митохондрий, могут «вытекать» из электронных комплексов транспорта и восстанавливать молекулярный кислород до супероксидных радикалов. При этом митохондрии становятся основным продуцентом супероксидных радикалов

Эксперименты были проведены на 30 беспородных крысах-самцах весом  $100 \pm 9$  г, с соблюдением правил Комиссии по этическим нормам Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого (г. Киев, Украина) работы с экспериментальными животными. Карциному Герена привили 20 животным, и они составили экспериментальную группу. Остальные 10 животных служили контрольной группой. Стромальные клетки и клетки паренхимы костного мозга получали из бедренных костей крыс путем стерильной промывки диафизов буферным раствором ( $\text{pH} = 7,4$ ) и дезагрегации полученной суспензии клеток костного мозга. Общее количество клеток костного мозга у животных подсчитывали в камере Горяева и выражали в количестве клеток на бедро (норма  $60,7 \pm 4,48 \cdot 10^6/\text{бедро}$ ).

Скорость генерирования супероксидного радикала определяли на ЭПР спектрометре с использованием спиновой ловушки хлоргидрата гидроксиламина-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипиперидина (TEMPONE-H), образующей с короткоживущим супероксидом стабильный радикал. Спектр ЭПР аддукта представляет собой три линии сверхтонкой структуры с фактором спектроскопического расщепления  $g = 2.005$  и константой сверхтонкого взаимодействия  $A = 13$  Гс (рисунок 2.1). Реакция накопления стабильных радикалов в кювете спектрометра ЭПР после введения в суспензию клеток ловушки протекала линейно на протяжении 10 - 15 мин. Спектры регистрировали



с двухминутными интервалами. По величине амплитуд второй компоненты спектра ЭПР радикала рассчитывалась скорость накопления радикала, которая соответствует скорости генерирования супероксидного радикал-аниона.

Исследованы уровни скорости генерирования супероксидных радикалов клетками костного мозга. На рисунке 2.2 представлены скорости генерирования супероксидных радикалов карциномой Герена (3), клетками костного мозга интактных животных (1) и животных с карциномой Герена (2). Известно, что клетки здорового организма генерируют супероксидные радикалы в базовых концентрациях и используют их в качестве сигнальных молекул. В костном мозге интактных животных регистрируются скорости генерирования супероксидных радикалов на уровне  $0,45 \pm 0,03$  нмоль/ $10^3$  клеток·мин; в костном мозге животных с опухолью –  $3,5 \pm 0,07$  нмоль/ $10^3$  клеток·мин, а в карциноме Герена –  $2,5 \pm 0,05$  нмоль/ $10^3$  клеток·мин. Из рисунка 2.2 следует, что скорость генерирования супероксидных радикалов в костном мозге животных с опухолью почти на порядок выше, чем у интактных животных.

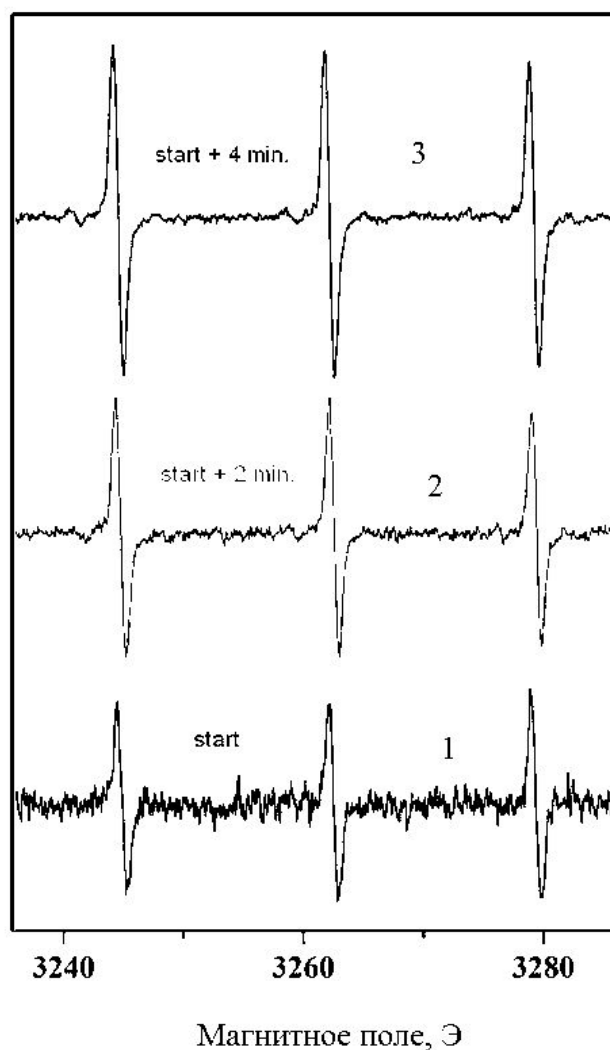


Рис. 2.1. Рост интенсивности сигнала ЭПР аддукта в через 2 (спектр 2) и 4 минуты (спектр 3) после начала регистрации (спектр 1) при исследовании скорости генерирования супероксидного радикала в костном мозге лабораторных мышей с привитой карциномой Герена. Измерения проведены при комнатной температуре с использованием в качестве спиновой ловушки соединения TEMPONE-H

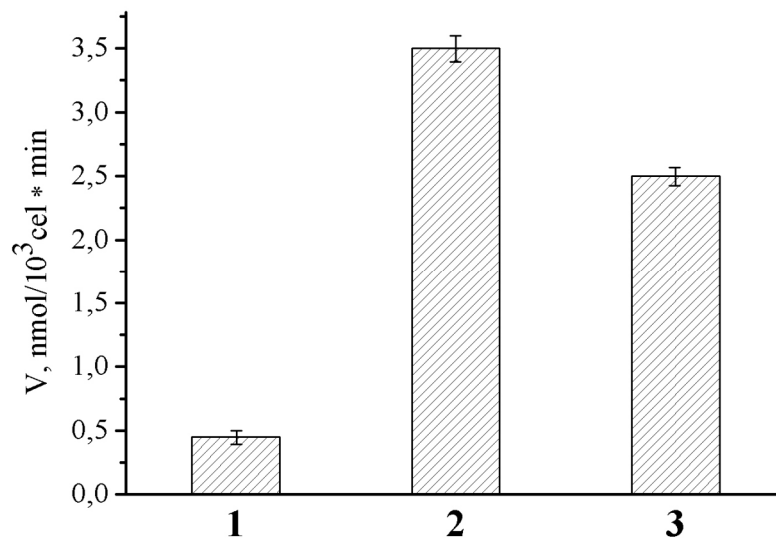


Рис. 2.2. Скорость генерирования супероксидных радикалов: в костном мозге intactных животных (столбик 1); в костном мозге животных с карциномой Герена (столбик 2); в карциноме Герена (столбик 3)

### 3. ОКСИД АЗОТА

Оксид азота – это двухатомный свободнорадикальный газ. По сравнению с другими биологически важными свободными радикалами, такими как супероксид ( $O_2^-$ ) или гидроксил (ОН), оксид азота сравнительно неактивен. Особенность химической структуры оксида азота состоит в его электронном строении. Помимо заполненных связывающих – одной  $\sigma$ - и двух  $\pi$ -орбиталей, на антисвязывающей  $\pi$ -орбитали NO находится неспаренный электрон, что дает суммарный порядок связи 2.5. Высокая энергия связи и тот факт, что неспаренный электрон позволяет NO взаимодействовать с переходными металлами и другими радикалами, делает возможным формирование связывающей орбитали неспаренными электронами. Концентрация NO *in vivo* варьируется от 5 нмоль/л до 4 мкмоль/л, тогда как концентрации свободных радикалов и переходных металлов, способных захватывать NO, в организме далеки от 4 мкмоль/л. Кроме того, оксид азота легко диффундирует: его коэффициент диффузии при 37°C в 1.4 раза больше, чем у кислорода. Оксид азота реагирует с оксигемоглобином с формированием нитрозил-гем-гемоглобина и нитрита. Более того, оксигемоглобин, по-видимому, имеет двойное назначение и служит не только буфером NO, но и его переносчиком.

#### 3.1 Значение оксида азота в биологических системах

Оксид азота является эндогенным газом с биохимическими свойствами свободного радикала. Поскольку NO легко проникает через мембраны и обладает высокой скоростью диффузии, он реагирует с большим числом молекул, включая гемсодержащие протеины. Оксид азота быстро окисляется кислородом до нитритов и/или нитратов. Его время жизни в биологических системах варьирует от 1 с в присутствии гемоглобина до ~30 с [3]. Синтез этой простой молекулы предполагает участие одного из наиболее сложных ферментов в природе – NO-синтазы (NOS), которая имеет несколько коферментов и

регулируется очень сложным образом. Многочисленные физиологические и патофизиологические функции оксида азота выполняются с использованием различных форм NO-синтазы. Существует три изоформы NO-синтазы: в нервной ткани (nNOS, тип I), в эндотелии кровеносных сосудов (eNOS, тип III) и в макрофагах (iNOS, тип II). Первые две формы являются  $Ca^{2+}$ -зависимыми и постоянно вырабатываются в нейронах и в сосудах, соответственно, тогда как iNOS является индуцибельной формой и выделяется в ответ на воздействие внешних факторов при воспалительных процессах [4]. Оксид азота, вырабатываемый в эндотелии сосудов, вызывает их расслабление. В макрофагах NO отвечает за их цитотоксическую функцию, а в центральной и периферической нервной системе NO служит нейромедиатором и нейромодулятором. Нерегулируемая выработка оксида азота может вызвать повреждения, приводящие к разрушению белков и ДНК и даже к гибели клетки.

Влияние оксида азота на тонус кровеносных сосудов и функции нейронов служит основой воздействия NO на нейроэндокринную систему, поведение, память, умственные способности и другие высшие психологические функции [5]. Существуют многочисленные данные, свидетельствующие о том, что оксид азота участвует в развитии таких серьезных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

### 3.2 Оксид азота при повреждении биологической ткани

Рассмотрим роль оксида азота при повреждении биологической ткани на примере травмы спинного мозга.

Травма спинного мозга протекает в две стадии. Первичное повреждение, вызванное механической травмой, приводит к разрушению мембран, гибели клеток и кровоизлиянию, однако конечное патофизиологическое поражение оказывается гораздо более серьезным по сравнению с тем, что диагностируется в первые часы после травмы. Причиной столь сильного поражения ткани является активация

биохимических и клеточных процессов, приводящих к прогрессирующей гибели клеток в поврежденной ткани. Данный каскад деструктивных процессов получил название вторичного повреждения. Отличительной особенностью травмы спинного мозга является продольное распространение вторичного повреждения, приводящее к дальнейшей сегментарной потере функций [6].

Свободные радикалы, такие как супероксид ( $O_2^-$ ) и гидроксил (ОН), в норме вырабатываются в небольших количествах в ходе клеточных процессов. Они играют важную физиологическую роль в качестве модуляторов рецепторной функции мембраны. Вследствие механического или гипоксического повреждения в пораженных тканях формируются свободные радикалы и оксид азота, причем в гораздо больших количествах вследствие недостаточной оксигенации тканей. Кроме того, свободные радикалы образуются в ходе многочисленных биохимических реакций в течение посттравматической реперфузии. Они реагируют с белками, нуклеиновыми кислотами и липидами, приводя к их повреждению и разрушению.

В норме в центральной нервной системе NO вырабатывается в небольших количествах нейронами и эндотелиальной тканью кровеносных сосудов. Оксид азота сам по себе не является токсичным и в нормальных условиях имеет свойство расширять сосуды. Однако при реакции NO с  $O_2^-$  образуется сильнейший оксидант, пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), который окисляет липиды, белки и ДНК. Именно эта реакция является причиной токсичного действия оксида азота при повреждении спинного мозга. Доказано, что после травмы спинного мозга в близлежащих тканях происходит существенное повышение концентрации NO [7]. Пероксинитрит вызывает разрушение нейронов и двигательную дисфункцию в спинном мозге крысы *in vivo*. Эндогенной защитой от свободных радикалов, в частности, от пероксинитрита, служит фермент супероксиддисмутаза (СОД, SOD). Считается, что чрезмерная продукция оксида азота является основной причиной нейротоксичности.

Существует много научных работ, посвященных изучению роли оксида азота при травме спинного мозга. Однако большинство из них основано на регистрации уровня NO-синтазы, поскольку прямая регистрация оксида азота зачастую оказывается затруднительной или вовсе невозможной из-за его высокой реактивности и короткого времени жизни. Как следует из проведенных исследований, после травмы спинного мозга в окружающих тканях повышается уровень активности всех типов NOS [8, 9]. Однако активность различных изоформ NOS возрастала в различные промежутки времени после операции: в первые часы после повреждения в случае конститутивной nNOS и eNOS (на 138% и 96% через 4 часа и 8 часов после операции, соответственно, по сравнению с интактными животными) и через более продолжительный период в случае индуцибельной iNOS (на 103% через 72 часа по сравнению с интактными животными) [10].

Для получения более полной картины процессов, происходящих в ходе вторичного поражения после повреждения спинного мозга, необходимо определить, как меняется концентрация NO в поврежденных тканях на различных сроках после травмы не с помощью косвенных методов, а посредством прямой регистрации NO.

### 3.3 Методы регистрации и химические особенности NO

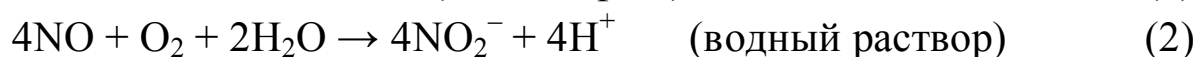
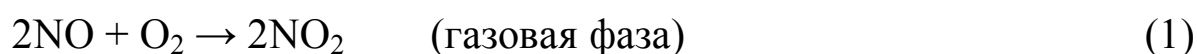
Поскольку NO является реактивным свободным радикалом и быстро окисляется до нитратов и нитритов, его количественный анализ довольно затруднителен. Существует несколько методов регистрации оксида азота, но вследствие недостаточной специфичности и чувствительности лишь немногие из них способны обеспечивать достаточно точные результаты. Выбор метода зависит от цели исследования – количественного или качественного анализа изучаемой системы.

Среди методов, предложенных к настоящему времени, электронный парамагнитный резонанс является наиболее удобным и надежным. Метод ЭПР широко применялся для выявления роли NO в

биологических системах. С этой целью можно использовать диамагнитные соединения, которые образуют стабильные парамагнитные комплексы с NO. Применительно к биологическим процессам важную роль играет высокое сродство NO к определенным классам комплексов железа(II). Данное свойство используется в наиболее распространенных спиновых ловушках для NO. Например, оксид азота реагирует с атомом Fe(II) гемоглобина и другими металлосодержащими гемами, также как и с дитиокарбаматными (ДТК) комплексами  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$ , образуя стабильные парамагнитные молекулы. Эти комплексы широко использовались при изучении химических и биологических свойств оксида азота. Использование железосодержащих комплексов для регистрации NO впервые было предложено А.Ф. Ваниным и сотр. [11].

Кроме комплексов Fe(II) с дитиокарбаматами, для регистрации оксида азота используют также другой ряд парамагнитных соединений - нитронилнитроксидов (ННР). Хотя химический состав этих соединений с NO сильно отличается от соединений NO с Fe(II), ННР имеют высокую специфичность и могут быть использованы для проведения количественного анализа NO в водной среде методом ЭПР. Кроме того, ННР применяются в качестве показателя расширения сосудов и в качестве антагониста NO в различных органах, а также в других областях биологии для изучения противомикробного действия NO.

Как уже отмечалось, оксид азота имеет относительно короткое время жизни. Он самопроизвольно вступает в реакции с кислородом со стехиометрией 2:1 в газовой фазе (1) и 4:1 в водном растворе (2).



Данные реакции служат основой для нескольких методов регистрации и количественного анализа NO, включая определение концентрации NO посредством измерения уровня кислорода и спектро-



фотометрические методы, такие как анализ в видимой и ультрафиолетовой областях спектра или флуоресцентный анализ.

В хемиллюминесцентном методе регистрации газовой фазы оксида азота используется реакция NO с озоном O<sub>3</sub>, проходящая по схемам (3) и (4):



Здесь NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> обозначает молекулу NO<sub>2</sub> в возбужденном состоянии, а *hν* – испускаемый фотон. Методы, основанные на хемиллюминесценции, идеальны для анаэробных растворов NO и имеют высокую чувствительность, однако требуют достаточно много времени и больших затрат.

Как отмечалось выше, оксид азота самопроизвольно вступает в реакции с протеинами гема, что служит основой для спектрофотометрического метода, где измеряется количество метгемоглобина, образующегося в результате реакции NO с оксигемоглобином. Кроме того, NO реагирует с диоксигемоглобином и образует стабильные нитрозильные аддукты, которые могут быть зарегистрированы с помощью метода ЭПР.

Содержание оксида азота можно измерить также, используя электрохимическое детектирование и другие спектроскопические методы, основанные на физических и химических свойствах NO.

Спектроскопия ЭПР продолжает играть значительную роль в эволюции понимания природы NO. Метод ЭПР точно воспроизводит спектральные характеристики индикаторной молекулы, отражая природу ее комплекса с NO в степени, недостижимой любыми другими методами. Поскольку оксид азота является парамагнитным соединением, он должен, в принципе, сам по себе детектироваться методом ЭПР. Однако в ряде случаев такая регистрация при комнатной температуре затруднительна ввиду большой ширины линий. Именно потому и необходима спиновая ловушка, которая обладает высоким сред-

ством к NO и образует с ним стабильный парамагнитный комплекс. Классические спиновые ловушки, такие как DMPO, не захватывают NO, поскольку NO имеет слабую тенденцию к образованию ковалентной связи с нерадикальными молекулами, необходимыми для типичной реакции спинового захвата. Однако NO быстро образует относительно стабильные лигандные связи с определенными комплексами железа, формируя нитрозильные соединения (рисунок 3.1).

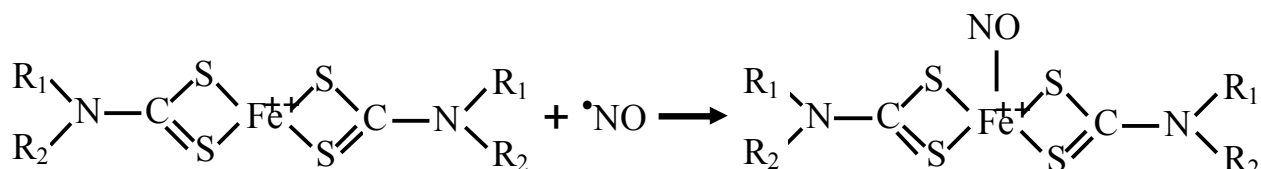


Рис. 3.1. Реакция спинового захвата NO комплексами Fe<sup>II</sup>(ДЭТК)<sub>2</sub>, (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) или Fe<sup>II</sup>(МГД)<sub>2</sub> (R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> и R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>(CHОН)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>ОН).

Без NO в качестве лиганда эти железосодержащие комплексы обычно невидимы методом ЭПР. Типичные комплексы NO с дитиокарбаматами железа – Fe<sup>II</sup>(NO)(ДЭТК)<sub>2</sub> (ДЭТК – N,N-диэтилдитиокарбамат) и Fe<sup>II</sup>(NO)(МГД)<sub>2</sub> (МГД – N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат) – дают спектры ЭПР, с помощью которых можно сравнительно легко идентифицировать и измерить количество оксида азота.

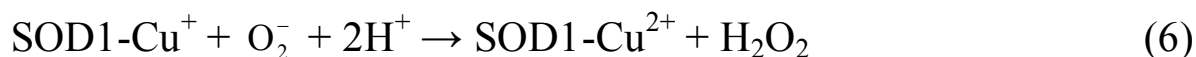
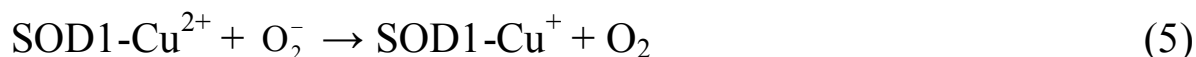
#### 4. КОМПЛЕКСЫ МЕДИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Медь является очень важным компонентом биологических систем, однако при нарушении нормальной регуляции она может вызывать токсические эффекты. У человека нарушение обмена  $\text{Cu(II)}$  в клетке влияет на нормальное развитие тканей, приводя к анемии, онкологическим заболеваниям и некоторым нейродегенеративным проявлениям. Причем к повреждениям приводит как избыток, так и недостаток меди(II). Для защиты от цитотоксического действия  $\text{Cu(II)}$  клетка располагает сложной системой регуляции выведения меди(II) [12].

Травма нейронов и нейродегенеративные нарушения, происходящие при травме спинного мозга, сопровождаются окислительным стрессом. Представляется весьма вероятным, что  $\text{Cu(II)}$  в нейронах имеет отношение к молекулярным механизмам, контролирующим эффективность работы системы антиоксидантной защиты клеток, равновесие между выживанием и гибелью клеток и, следовательно, между двумя процессами – дегенерацией и регенерацией. Доказано, что дефицит меди приводит к значительному уменьшению активности  $\text{Cu,Zn-SOD}$ , в результате чего снижается антиоксидантная защита. Нарушение обмена меди и мутации фермента  $\text{Cu,Zn-SOD}$  в биологических системах приводят к токсическим эффектам и селективному разрушению двигательных нейронов. Поэтому оценка уровня  $\text{Cu(II)}$  в нервной ткани имеет существенное значение для анализа молекулярных и клеточных механизмов антиоксидантной защиты клеток, взаимоотношений между антиоксидантной и контролирующей апоптоз системами, что важно для предотвращения гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и травмах. С другой стороны, такая оценка желательна и потому, что избыточное накопление  $\text{Cu(II)}$  в клетках вследствие нарушения ее выведения вызывает цитотоксический эффект [13].

## 4.1 Cu,Zn-супероксиддисмутаза

Реактивные формы кислорода в нормальных условиях отвечают за физиологическую активность тканей мозга, но они связаны также с некоторыми неврологическими нарушениями и возрастными заболеваниями. Эти соединения выделяются в нормальных условиях митохондриями, а также в процессе воспаления, и оказывают сильное токсическое действие на клетки, окисляя протеины, липиды и модифицируя ДНК. Кроме того, они снижают ферментативную активность, могут вызвать мутации ДНК и смерть клетки через некроз или апоптоз. Для защиты от подобных повреждений свободными радикалами в клетках млекопитающих существует антиоксидантная система, которая состоит из многочисленных компонентов, взаимодействующих сложным образом. Одним из наиболее важных ферментов антиоксидантной системы является супероксиддисмутаза, которая катализирует преобразование супероксид радикалов ( $O_2^-$ ) в кислород ( $O_2$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ) в соответствии со схемами (5) и (6).



В клетках животных представлены два типа СОД: СОД1, содержащая медь и цинк (Cu,Zn-СОД), и СОД2, содержащая марганец (Mn-СОД). Cu,Zn-СОД представляет собой сложный протеин, находящийся в цитозоле клетки. Он может инактивироваться при воздействии супероксид-радикалов, а также секретироваться во внеклеточное пространство. Экспрессия Mn-СОД регулируется сложным образом различными клеточными структурами и так же, как и Cu,Zn-СОД, отвечает за защиту клеток от оксидантного повреждения. Обе формы СОД представлены в центральной нервной системе [14].

Многочисленные исследования показали, что мутации и нарушения активности данного фермента могут приводить к различным патологиям, от повреждений печени до серьезных нарушений ЦНС.

До сих пор остается неясным, почему мутации фермента Cu,Zn-СОД, экспрессируемого во многих типах нейронов, вызывают гибель избирательно двигательных нейронов, как это наблюдается при боковом амиотрофическом склерозе [15, 16].

#### 4.2 Регистрация комплекса $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$

Как отмечалось, комплекс  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  широко применяется для регистрации оксида азота методом ЭПР в биологических системах *in vivo* и *in vitro*, причем формирование данного комплекса происходит непосредственно в исследуемой системе, так как ДЭТК и  $\text{Fe}^{\text{II}}$  вводятся отдельно в виде солей. При этом в спектре ЭПР кроме сигнала от комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  обнаруживается также сигнал из четырех линий от комплекса  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ . Это происходит благодаря способности дитиокарбаматов образовывать комплексы с ионами не только железа, но и других переходных металлов, а медь в составе ферментов присутствует во многих тканях.

Таким образом, введение в инкубирующие смеси значительного избытка диэтилдитиокарбаматного лиганда открывает удобную возможность для надежного контроля содержания  $\text{Cu}(\text{II})$  в тканях и органах, которое резко меняется при патологических состояниях и представляет диагностическую ценность [17, 18]. В этих условиях медь фиксируется в виде бис-(N,N-диэтилдитиокарбамато)меди(II),  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ , по спектрам ЭПР, которые характеризуются узкими линиями и расщеплением от изотопов  $^{63}\text{Cu}$  и  $^{65}\text{Cu}$  как в диамагнитно-разбавленных монокристаллах [19], так и в жидких и замороженных растворах [20].

## 5. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ FE-ДТК В КАЧЕСТВЕ СПИНОВОЙ ЛОВУШКИ ДЛЯ NO

Благодаря своим аномальным магнитным и электронным свойствам железо-дителиокарбаматные комплексы,  $\text{Fe}(\text{ДТК})_n$ , и железонитрозильные комплексы,  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$ , активно изучались с 1960 г. Исследования показали, что их уникальные свойства по большей части объясняются характерной резонансной структурой лиганда. В 1991 г. Ванин и коллеги [21] начали применять комплекс  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$  в качестве спиновой ловушки для регистрации NO в биологических образцах, поскольку после открытия физиологической роли оксида азота разработка аналитических методов исследования эндогенного NO стала необычайно важной. Среди нескольких новых методов регистрации эндогенного NO метод спиновых ловушек в сочетании с ЭПР-спектроскопией является наиболее точным и надежным. Одним из главных преимуществ данного метода явилась возможность проведения измерений *in vivo* [22].

### 5.1 Дителиокарбаматы в качестве спиновых ловушек

Производные дителиокарбаматов (ДТК) образуют различные комплексы с ионами железа:  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_3^-$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДТК})_3$  и  $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{ДТК})_3^+$ . Регистрация NO при помощи комплексов  $\text{Fe}(\text{ДТК})_n$  в качестве спиновой ловушки основана на формировании стабильного комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$ , который дает характерный спектр ЭПР из 3-х линий ( $g_{\text{av}} = 2.04$ ) при комнатной температуре и спектр с аксиальной симметрией ( $g_{\perp} = 2.037$ ,  $g_{\parallel} = 2.015$ ) при низких температурах (рисунок 5.1). Комплексы  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДТК})_3$  могут непосредственно реагировать с NO с образованием соединения  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$  даже в присутствии кислорода.

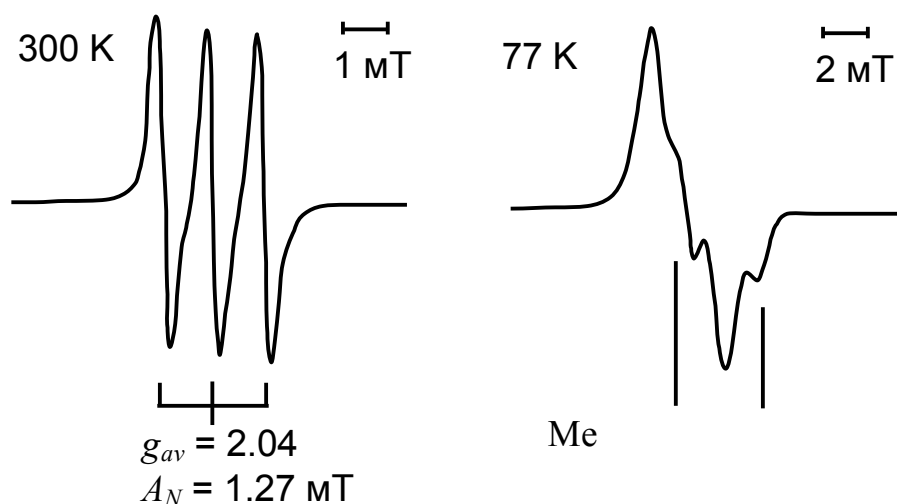


Рис. 5.1. Спектр ЭПР  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТКС})_2$  в водном растворе при комнатной температуре (слева) и при температуре жидкого азота,  $T = 77$  К (справа)

Производные ДТК можно разделить на две группы в соответствии с растворимостью их комплекса с железом(II) в воде: ДЭТК (N,N-диэтилдитиокарбамат) и ПДТК (пирролидиндитиокарбамат) – типичные представители, образующие нерастворимые в воде комплексы, а МГД (N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат), ДТКС (N-(дитиокарбоксо)саркозин), ПродТК (L-пролиндитиокарбамат) и МСД (N-метил-L-сериндитиокарбамат) образуют водорастворимые комплексы (см. Таблица 1. Характеристики спиновых меток на основе ДТК – комплексов  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$  и рисунок 5.2).

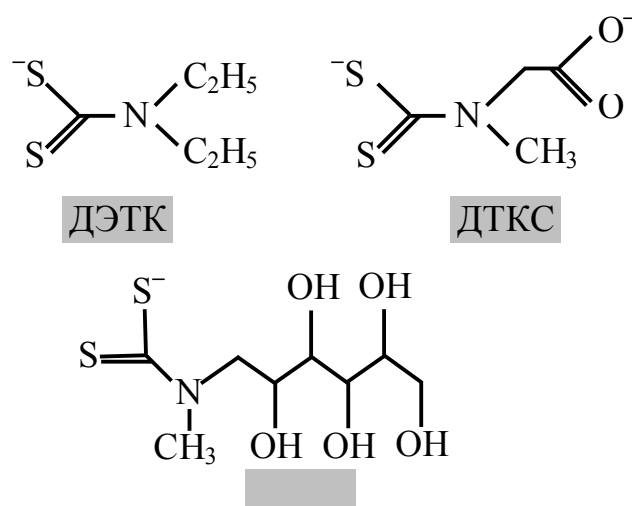


Рис. 5.2. Некоторые производные дитиокарбамата,  
используемые в качестве спиновых ловушек

*Таблица 1*

Характеристики спиновых меток на основе ДТК – комплексов  
 $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТК})_2$ .

ДТК	Растворимость в $\text{H}_2\text{O}$	Заряд комплекса с NO
ДЭТК	нерастворим	0
ПДТК	нерастворим	0
МГД	растворим	0
ДТКС	растворим	-2
ПродТК	растворим	-2
МСД	растворим	-2

Растворимость в воде зависит от заряда сформированного комплекса. Так, сравнительная растворимость комплексов  $\text{Fe}(\text{II})$  изменяется в ряду лигандов  $\text{ДТКС} > \text{МГД} \gg \text{ДЭТК} \approx 0$ . Данная тенденция еще более заметна на примере комплексов  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$ . Действительно, растворимость нейтрального комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  менее 1 мМ, тогда как у  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТКС})_2^{2-}$  более 100 мМ.



Растворимость комплексов является важным фактором при их практическом использовании. Например, процесс приготовления комплексов и их распределение по биологическому образцу во многом зависят от растворимости соединений.

Все производные ДТК также могут быть использованы в качестве спиновых ловушек. Даже такие нестандартные цели, как аккумуляция в определенном органе, могут быть достигнуты модификацией функциональной группы ДТК. Например,  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДТКМП})_2$  (ДТКМП – дитиокарбоксит-4-транс-метоксиметил-*L*-пролин) обладает уникальным свойством образовывать соединения с оксидом азота исключительно в крови [23]. Однако производные ДТК и комплексы  $\text{Fe}(\text{ДТК})_n$  являются экзогенными веществами в биологических системах, и необходимо уделять отдельное внимание их физиологическому действию и токсичности. Известно, что производные ДТК вызывают прооксидантные и антиоксидантные эффекты в бесклеточных и многоклеточных биологических системах. Так, некоторые производные ДТК, образуя нерастворимые в воде комплексы с железом, предотвращают выработку NO-синтазы, т.е. ведут себя как антиоксиданты. Кроме того, производные ДТК образуют комплексы со многими металлами, из-за чего используются для анализа микроэлементов и при лечении отравления медью и никелем. В связи с данным свойством ДЭТК способен ингибировать активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы путем захвата иона меди, тогда как производные ДТК, образуя водорастворимые комплексы с металлами, не захватывают медь(II).

## 5.2 Реакционная способность комплексов Fe-ДТК по отношению к NO и стабильность комплексов с NO

На сегодняшний день весьма подробно изучены химические свойства комплексов состава  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$ , ключевых соединений для метода регистрации NO с помощью спиновых меток. Синтезированы нитрозильные комплексы железа с многочисленными произ-

водными ДТК. Электронная конфигурация этих пентакоординационных комплексов может быть представлена как  $\{\text{FeNO}\}^7$ , где индекс 7 относится к числу электронов на  $d$ -орбиталях металла и  $\pi^*$ -орбитали NO [24]. Комплексы  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$  парамагнитны и имеют квадратно-пирамидальную геометрию с незначительным смещением железа из основной плоскости и почти линейной ориентацией группы NO (угол Fe-N-O = 170-179°) в аксиальной позиции. Многочисленные спектроскопические исследования показали, что неспаренный электрон комплекса находится на разрыхляющей орбитали, преимущественно  $d_{z^2}$  (Fe) и  $\sigma^*$  (NO). Структура, магнетизм и электронные состояния комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$  зависят в основном от замещающей группы при аминном атоме азота в ДТК.

Динамические характеристики комплексов  $\text{Fe}(\text{ДТК})_n$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДТК})_2$  в качестве спиновой ловушки NO, такие как реакционная способность по отношению к NO и стабильность комплексов с NO, являются не менее важными факторами, так как регистрация сопровождается динамическим процессом, и данные свойства существенно влияют на чувствительность метода. Отметим, что эффективность захвата NO комплексом  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДТК})_3$  зависит и от заместителей у лиганда, и от свойств среды.

На практике эффективность спинового захвата необходимо учитывать при количественном анализе NO в биологических системах. Содержание NO в образце вычисляется из интенсивности сигнала ЭПР. Но поскольку оценивается лишь то количество NO, которое было захвачено комплексом, реальное количество NO в образце часто недооценивается. Абсолютное содержание NO в образце можно оценить, принимая во внимание интенсивность наблюдаемого сигнала ЭПР и тщательно рассчитанную эффективность захвата комплекса.

Комплексы  $\text{Fe}(\text{ДТК})_n$ , используемые для оценки содержания NO в различных системах, обычно считаются стабильными без вовлечения их в окислительно-востановительный цикл, однако это утверждение не всегда справедливо. Как известно, комплексы  $\text{Fe}^{\text{II}}$  легко окисляются в присутствии кислорода с формированием комплексов

$\text{Fe}^{\text{III}}$ . Возможно, что и комплексы  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$  подвержены окислению, либо в ходе реакции формируются комплексы  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ , которые позднее восстанавливаются. В ранних работах [24, 25] показано, что окисление гидрофильных моонитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с МГД имеет место *in vivo* и *in vitro*. Это окисление ведет к трансформации парамагнитной формы МНКЖ-МГД,  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{МГД})_2 \equiv \text{Fe}^{\text{I}}(\text{NO}^+)(\text{МГД})_2$  в диамагнитную, которая характеризуется электронной конфигурацией железа  $d^6$  ( $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO}^+)(\text{МГД})_2$ ). Эта форма может быть зарегистрирована с помощью ЭПР-спектроскопии только после ее восстановления в парамагнитное состояние, однако ранее было неизвестно, происходит ли реакция восстановления *in vivo*. Обратимое восстановление также может происходить в случае гидрофобных комплексов МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или диметилдитиокарбаматом (ДМТК) [26].

Ответы на вышеперечисленные вопросы даны в более поздних работах Ванина и сотр. [27, 28]. С традиционной точки зрения считается, что оксид азота захватывается только диамагнитным комплексом двухвалентного железа с дитиокарбаматом. Однако было установлено, что значительные количества моонитрозильных комплексов образуются в тканях животных при введении комплексов трехвалентного железа с диэтилдитиокарбаматом,  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДЭТК})_3$ . На первый взгляд, можно предположить, что комплекс  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДЭТК})_3$  в организме восстанавливается до  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  перед тем, как захватить NO. Восстановление может происходить за счет внутренних восстановителей, таких как тиолы или тиолсодержащие соединения. Однако дальнейшие исследования продемонстрировали, что комплекс  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ДЭТК})_3$  также имеет способность захватывать NO с формированием диамагнитных комплексов  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_3$  ( $S=0$ ), которые впоследствии могут быть преобразованы в парамагнитное двухвалентное состояние с участием экзогенных или эндогенных восстановителей. Предложенная реакция получила название «восстановительного нитрозирования». Количество парамагнитного комплекса МНКЖ-ДЭТК резко возрастало при введении сильного восстановителя дитионита в экс-

тракт ткани животного, которому вводились  $\text{Fe}^{\text{II}}$  и ДЭТК. Эксперименты продемонстрировали, что данный рост не был вызван прямым восстановлением эндогенных нитритов дитионитом. Результаты подтвердили существование в тканях *in vivo* диамагнитных комплексов NO с дитиокарбаматами  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Трехвалентное состояние железа в окисгенированных тканях является результатом высокой скорости окисления комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  кислородом ( $k = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Таким образом, утверждение о том, что МНКЖ с дитиокарбаматами образуются в результате захвата NO только комплексами двухвалентного железа с дитиокарбаматами, становится спорным.

Рисунок 5.3 иллюстрирует два возможных пути трансформации окисленных ловушек {комплекс (I)} в парамагнитное соединение (IV). В соответствии с первым механизмом, комплекс (I) сначала восстанавливается некоторым эндогенным восстановителем, и промежуточный комплекс (II) впоследствии нитрозируется, захватывая радикал NO. Данный путь согласуется с традиционной точкой зрения. Второй возможный механизм реакции предполагает сначала нитрозирование комплекса (I) до диамагнитного комплекса (III), который затем восстанавливается до парамагнитного комплекса (IV), что противоречит общепринятой точке зрения.

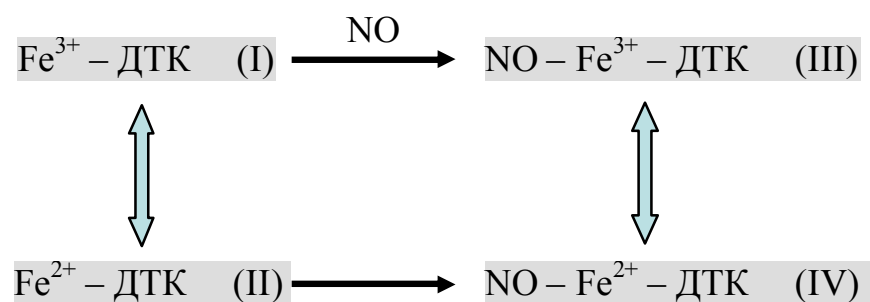


Рис. 5.3. Четыре возможных комплекса Fe-ДТК; комплексы (I) и (III) диамагнитны, тогда как (II) и (IV) являются парамагнитными [29]

В принципе, оба пути возможны при том условии, что реакции (I)↔(II) и (III)↔(IV) являются обратимыми. Окислительно-восстановительные свойства системы определяют, какая из реакций будет доминировать. Однако в биологических системах при нормальных условиях скорости реакций восстановления эндогенными восстановителями, такими как *L*-цистеин или глутатион (в анионной форме), весьма умеренны. Скорости подобных реакций как минимум на два порядка меньше, чем скорости обратного окисления молекулярным кислородом из межклеточного пространства тканей животных.

Водорастворимые комплексы Fe(MГД)<sub>n</sub> не проникают сквозь гидрофобные клеточные мембраны и преимущественно остаются локализованными в межклеточном пространстве, где концентрация тиоловых форм меньше, чем во внутриклеточных компартментах. Следовательно, из-за высокой скорости окисления комплексы железа(III) будут преобладать над комплексами железа(II). Аналогичная ситуация наблюдается в случае гидрофобных комплексов Fe(ДЭТК)<sub>n</sub>, локализованных в гидрофобных компартментах тканей, где они защищены от прямого контакта с гидрофильными молекулами цистеина или глутатиона.

Важно отметить, что типичная реакция спинового захвата в клетках или тканях животных и растений на выходе дает смесь с оп-

ределенным соотношением диамагнитных и парамагнитных железонитрозильных комплексов. Несомненно, эндогенные восстановители могут повысить это соотношение в пользу парамагнитного комплекса (IV), и наличие этих эндогенных восстановителей может служить вполне правдоподобным объяснением успешного применения дитиокарбаматных комплексов железа для регистрации NO *in vivo*. Однако эксперименты доказывают, что значительная часть железонитрозильных комплексов остается в диамагнитном состоянии. При введении крысам комплекса  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{МГД})_3$  их моча содержала большое количество парамагнитных комплексов  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{МГД})_2$ , причем при добавлении восстановителя количество этих комплексов сильно возросло.

Таким образом, для достижения более точных результатов при количественном анализе содержания NO в исследуемой системе необходимо *ex vivo* добавлять восстановитель, например дитионит ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ). Однако восстановление биологических образцов дитионитом может вызвать артефактное выделение NO при восстановлении эндогенных нитритов с изменением pH среды. Этого артефакта можно избежать применением подходящего буфера к исследуемым образцам. Следует заметить, что введение дитионита будет приводить к восстановлению меди(II) из комплекса  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  до меди(I), что упрощает спектр ЭПР и облегчает регистрацию NO, но при этом вызывает потерю ценной информации о содержании меди(II) в биологических тканях.

## 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ NO И Cu(II) В НЕРВНОЙ ТКАНИ

### 6.1. Приготовление спиновых ловушек

Приготовление спиновых ловушек для образования парамагнитных комплексов  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  (на примере образцов спинного мозга крысы, забранных из области дозированного контузионного повреждения, или образцов из периферической нервной системы, как то фрагменты седалищного нерва крысы на разных сроках регенерации или спинальный ганглий поясничного отдела) проводится следующим образом.

1) Введение 1 мл буфера на основе N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты – HEPES (50 мМ, рН 7.4) с добавками 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина – BSA, 1 мг/мл NaДЭТК (5.8 мМ) и 0.4 мг/мл  $\text{FeSO}_4$  (2.6 мМ). При этом лиганд ДЭТК, ионы железа и NO формируют стабильный, детектируемый при помощи ЭПР комплекс  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ . Одновременно происходит связывание Cu(II) и ДЭТК с формированием комплекса  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ , также детектируемого при помощи ЭПР.

2) Инкубация реакционной смеси в течение 30 минут при температуре 37°C.

3) Охлаждение смеси и добавление к ней 0.2 мл свежеперегнанного этилацетата, предварительно насыщенного водой.

4) Интенсивное взбалтывание полученной смеси в течение 3 минут и последующее центрифугирование при 6000g в течение 8 минут.

5) Отделение органической фазы и помещение ее в кварцевые трубки с внутренним диаметром  $3 \pm 0.1$  мм.

Описанный метод позволяет экстрагировать гидрофобные комплексы  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  из водной фазы в органическую – этилацетат. Это в свою очередь создает благоприятные условия для определения концентрации комплексов методом ЭПР: во-

первых, пробы можно хранить до проведения измерения в течение долгого времени; во-вторых, отпадает необходимость применения специальных методик исследования водных растворов, таких как замораживание образцов в жидком азоте или использование особо тонких капилляров.

### 6.1 Спектры ЭПР $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$

Характерный спектр образца, содержащего комплексы  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  в среде этилацетата при комнатной температуре, представлен на рисунке 6.1.

Спектр ЭПР комплекса  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  состоит из четырех линий ( $g = 2.044$ ), соответствующих магнитной сверхтонкой структуре изотопов  $^{63}\text{Cu}$  и  $^{65}\text{Cu}$  с незначительно отличающимися константами сверхтонкого взаимодействия ( $A_{\text{стс}} = 78 \pm 1$  и  $82 \pm 1$  Гс). Наличие двух изотопов меди приводит к наблюдению в спектре ЭПР  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  на рисунке 6.1 небольшого расщепления линии в магнитном поле 3547 Гс и уширению остальных линий.

Сигнал от комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  с неспаренным электроном, локализованным на NO, имеет вид тройки линий с  $g = 2.038$ , образующейся вследствие сверхтонкого взаимодействия электрона с ядром азота  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ),  $A_{\text{стс}} = 12 \pm 1$  Гс.

Форма сигнала ЭПР практически не изменяется от образца к образцу, меняется лишь соотношение интенсивностей сигналов от  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ . Спектр комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  практически не перекрывается со спектром  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ , и это позволяет производить точные измерения интенсивности каждого из сигналов ЭПР.

Для увеличения точности определения концентрации комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  необходимо дополнительно регистрировать расширенную область спектра ЭПР, содержащую линии этого комплекса. Для уменьшения шумов в спектре константа времени интегрирования



при этом увеличивается до максимальной для данного спектрометра величины 5 с (рисунок 6.2).

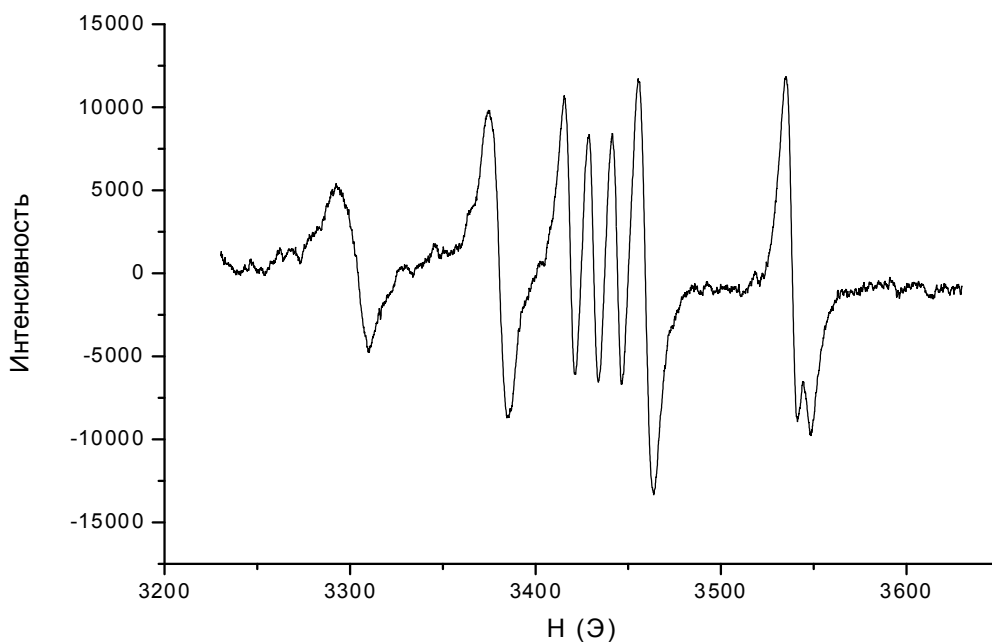


Рис. 6.1. Типичный спектр ЭПР образца в этилацетате при комнатной температуре, постоянная времени интегрирования 655 мс

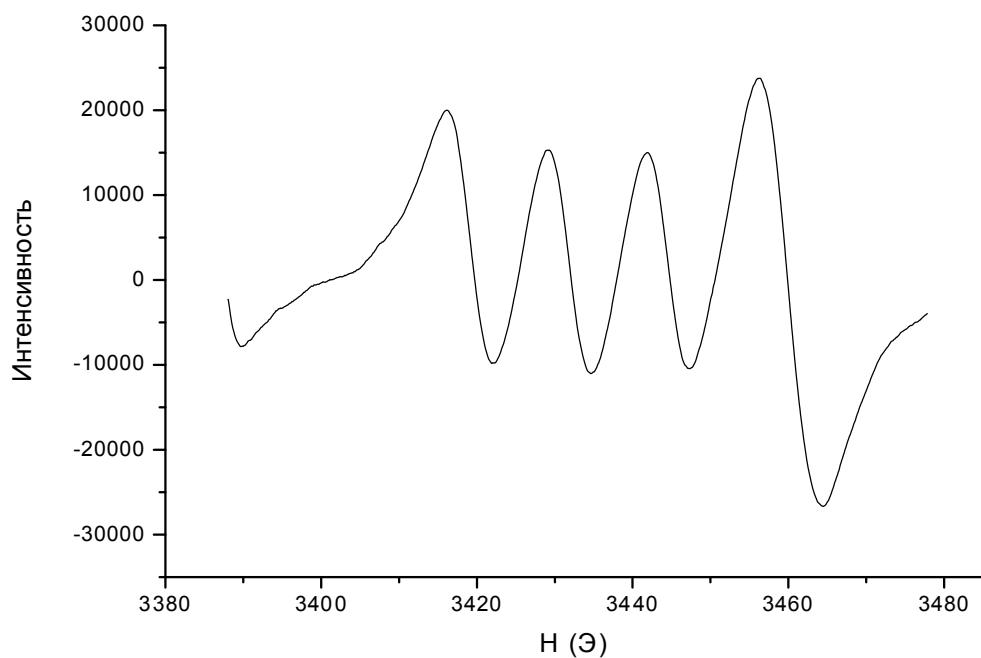


Рис. 6.2. Фрагмент типичного спектра ЭПР образца в этилацетате при комнатной температуре, постоянная времени интегрирования 5 с

### 6.3 Методика определения концентраций $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$

Концентрацию комплексов  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  определяют путем сравнения спектров ЭПР исследуемых образцов и эталонов с известным содержанием этих комплексов, что выполняется при помощи специально созданной программы (рисунок 6.3).

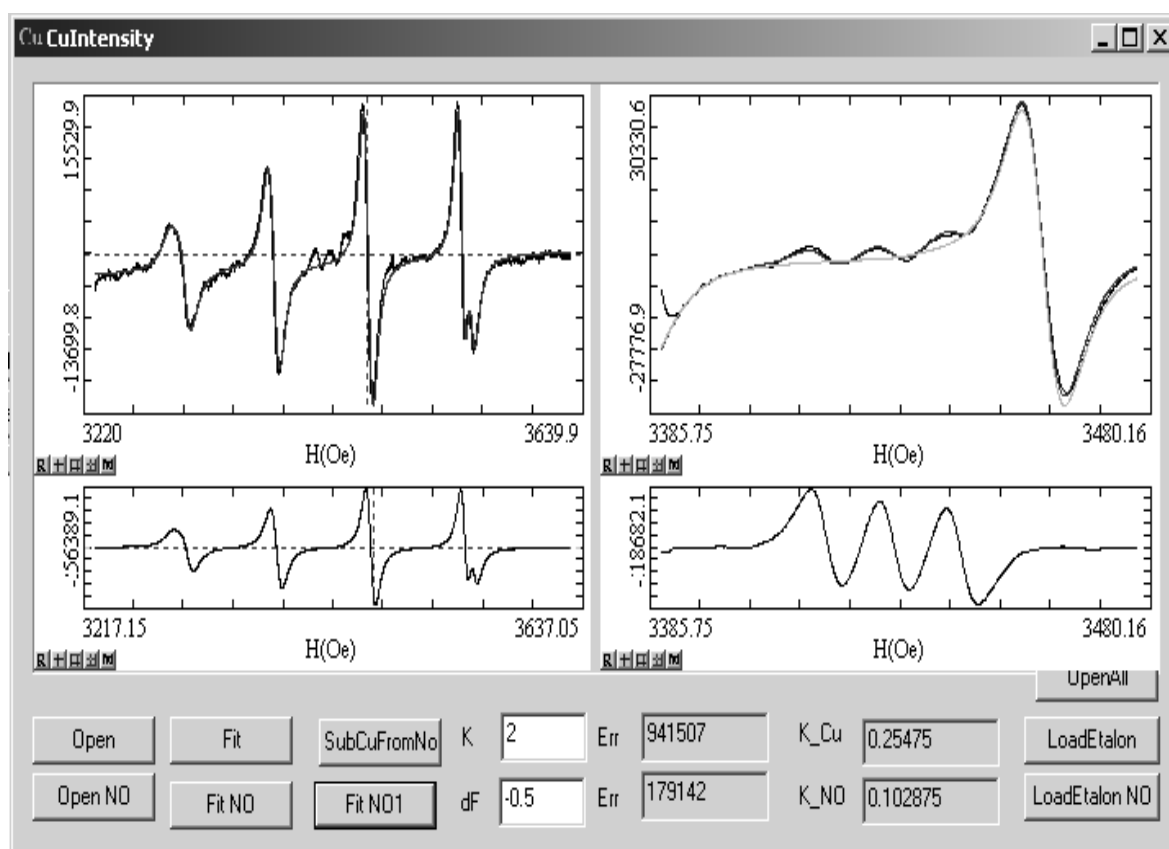


Рис. 6.3. Рабочее окно программы определения концентраций комплексов  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ . Левая панель: измеренный в эксперименте спектр ЭПР образца (вверху) и спектр эталона с концентрацией комплекса  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$   $2.00 \cdot 10^{-3}$  М (внизу). Правая панель: спектр ЭПР образца в области сигнала комплекса  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  (вверху) и спектр эталона с концентрацией  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$   $7.23 \cdot 10^{-6}$  М

Для обработки данных необходимо загрузить экспериментальные спектры ЭПР и нажать кнопки «Fit» и «FitNO1». С целью определения концентраций комплексов  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  полученные коэффициенты  $K_{\text{Cu}}$  и  $K_{\text{NO}}$  следует умножить на концентрации  $2.00 \cdot 10^{-3}$  М и  $7.23 \cdot 10^{-6}$  М, соответственно.

Алгоритм программы предусматривает следующие процедуры:

1. Сравнение пиковой интенсивности линий и подбор коэффициента умножения ( $k$ ) методом наименьших квадратов:

$$F_{\min} = \sum (Y_i^{\text{exp}} - kY_i^{\text{etal}} - A - BX_i)^2, \text{ где } k, A \text{ и } B - \text{ константы.}$$

Решение системы уравнений  $dF/dk = 0$ ;  $dF/dA = 0$ ;  $dF/dB = 0$  приводит к единственному набору значений  $k, A, B$ .

2. Подбор параметров базовой линии и ее вычитание.

3. Компенсация разности положений линий спектров ЭПР, возникающей из-за различных частот измерений исследуемых образцов и эталона.

В результате многократных повторений подбирается оптимальный коэффициент  $k$  для вычисления неизвестной концентрации в исследуемом образце.

## 7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1. Получить у преподавателя образцы биологической ткани и подготовить его для измерения (см. раздел 6.1).
2. Настроить ЭПР-спектрометр.
3. Зарегистрировать спектр ЭПР образца.
4. Используя компьютерную программу, определить концентрацию комплексов  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$  и  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$  в образце.
5. Сопоставить полученные результаты с данными предыдущих исследований и сделать выводы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Экспериментальные методы химической кинетики: Учебн. пособие [Текст] / Ред. Н.М. Эммануэль, М.Г. Кузьмин. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1985. – 176 с.

2. Davies, M.J. Recent developments in EPR spin-trapping / M.J. Davies [Text] // Electron Paramagnetic Resonance. Vol.18 / Eds. B.C. Gilbert, M.J. Davies, D.M. Murphy. – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. – P. 47-73.

3. Sun, J. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay [Text] / J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein // Sensors. – 2003. – Vol. 3, N 8. – P. 276-284.

4. Urushitani, M. The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis [Text] / M. Urushitani, S. Shimohama // ALS and other Neuron Disorders. – 2001. – Vol. 2, N 2. – P. 71–81.

5. Nelson, R.J. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior [Text] / R.J. Nelson, L.J. Kriegsfeld, V.L. Dawson, T.M. Dawson // Frontiers in Neuroendocrinology. – 1997. – Vol. 18, N 4. – P. 463–491.

6. Hausmann, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury [Text] / O.N. Hausmann // Spinal Cord. – 2003. – Vol. 41, N 7. – P. 369–378.

7. Soy, O. Time-level relationship for nitric oxide and the protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury [Text] / O. Soy, Ö. Aslan, H. Uzun, Ş. Barut, İ.A. Akyıldız, A. Belce, A. Çolak // Acta Neurochir. (Wien). – 2004. – Vol. 146, N 12. – P. 1329-1335.

8. Kwak, E.K. The role of inducible nitric oxide synthase following spinal cord injury in rat [Text] / E.K. Kwak, J.W. Kim, K.S. Kang et al. // Korean Med. Sci. – 2005. – Vol. 20, N 4. – P. 663-669.

9. Miscusi, M. The role of constitutive nitric oxide synthase in pathogenesis of secondary lesion after spinal cord injury. Preliminary results / M. Miscusi // J. Neurosurg. Sci. – 2002. – Vol. 46, N 2. – P. 55-59.

10. Diaz-Ruiz, A. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats / A. Diaz-Ruiz, A. Ibarra, F. Pérez-Severiano, G. Guízar-Sahagún, I. Grijalva, C. Ríos // *Neuroscience Lett.* – 2002. – Vol. 319, N 3. – P. 129-132.

11. Vanin, A.F. Appearance of nitric oxide in animal tissues in vivo / A.F. Vanin, E.I. Mordvintcev, A.L. Kleschyov // *Stud. Biophys.* – 1984. – Vol. 102, N 1. – P. 135-143.

12. Sanokawa-Akakura, R. A novel role for the immunophilin FKBP52 in copper transport [Text] / R. Sanokawa-Akakura, H. Dai, S. Akakura, D. Weinstein, J.E. Fajardo, S.E. Lang, S. Wadsworth, J. Siekierka, R.B. Birge // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 27. – P. 27845–27848.

13. Harris, Z.L. Genetic and molecular basis for copper toxicity [Text] / Z.L. Harris, J.D. Gitlin // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1996. – Vol. 63, N 5. – P. 836S-841S.

14. Perraut, M. Inducible nitric oxide synthetase and manganese superoxide dismutase expression in primary cultures of rat glial cells [Text] / Perraut M., Tholey G. // *INABIS'98. 5th Internet World Congress for Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, 1998.*

15. Furukawa, Y. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis [Text] / Y. Furukawa, T.V. O'Halloran // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – Vol. 8, N 5. – P. 847–867.

16. Liu, J. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria [Text] / J. Liu, C. Lillo, P. Jonsson, C. Velde, C. Ward, T. Miller, J. Subramaniam, J. Rothstein, S. Marklund, P. Andersen // *Neuron.* – 2004. – Vol. 43, N 1. – P. 5-17.

17. Suzuki, Y. The origin of an EPR signal observed in dithiocarbamate-loaded tissues: copper(II)–dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines [Text] / Y. Suzuki, S. Fujii, T. Tominaga, T.

Yoshimura, H. Kamada // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1335, N 3. – P. 242-245.

18. Aganov, A.V. Cu(II) content in the structures of the peripheral nervous system at their damage [Text] / A.V. Aganov, D.S. Guseva, D.G. Zverev, N.I. Silkin, V.G. Shtyrlin, Yu.A. Chelyshev // *Appl. Magn. Reson.* – 2006. – Vol. 30, N 1. – P. 201-206.

19. Reddy, T.R. ESR and optical absorption studies in copper diethyldithiocarbamate [Text] / T.R. Reddy, R. Srinivasan // *J. Chem. Phys.* – 1965. – Vol. 43, N 4. – P. 1404-1409.

20. Маров, И.Н. ЭПР и ЯМР в химии координационных соединений [Текст] / И.Н. Маров, Н.А. Костромина. – М.: Наука, 1979. – 267 с.

21. Mordvintcev, P. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy [Text] / P. Mordvintcev, A. Mülsch, R. Busse, A. Vanin // *Anal. Biochem.* – 1991. – Vol. 199, N 1. – P. 142-146.

22. Fujii, S. A new trend in iron-dithiocarbamate complexes: as an endogenous NO trapping agent [Text] / S. Fujii, T. Yoshimura // *Coord. Chem. Rev.* – 2000. – Vol. 198, N 1. – P. 89-99.

23. Nakagawa, H. Spin trapping for nitric oxide produced in LPS-treated mouse using various new dithiocarbamate iron complexes having substituted proline and serine moiety [Text] / H. Nakagawa, N. Ikota, T. Ozawa, T. Masumizu, M. Kohno // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – Vol. 45, N 6. – P. 1129-1138.

24. Mikoyan, V.D. Complexes of Fe<sup>2+</sup> with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues: comparative investigations [Text] / V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, V.A. Serezhenkov, R.A. Stukan, A.F. Vanin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1336, N 2. – P. 225-234.

25. Fujii, S. Nitric oxide trapping efficiencies of water-soluble iron(III) complexes with dithiocarbamate derivatives [Text] / S. Fujii, T.

Yoshimura, H. Kamada // *Chem. Lett.* – 1996. – Vol. 25, N 9. – P. 785-786.

26. Vanin, A.F. Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps of nitric oxide in biological systems [Text] / A.F. Vanin, X. Liu, A. Samouilov, R.A. Stukan, J.L. Zweier // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1474, N 3. – P. 365-377.

27. Vanin, A.F. Reduction enhances yields of nitric oxide trapping by iron–diethyldithio-carbamate complex in biological systems [Text] / A.F. Vanin, L.M. Bevers, V.D. Mikoyan, A.P. Poltorakov, L.N. Kubrina, E. van Faassen // *Nitric Oxide.* – 2007. – Vol. 16, N 1. – P. 71-81.

28. Vanin, A.F. Why iron–dithiocarbamates ensure detection of nitric oxide in cells and tissues / A.F. Vanin, A.P. Poltorakov, V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, E. van Faassen // *Nitric Oxide.* – 2006. – Vol. 15, N 2. – P. 295-311.