——— БИОФИЗИКА **КЛЕТКИ** =

УДК 577.3

ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА И ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА И ФЕРРИТИНА

© 2021 г. В.А. Медведева*, **, М.В. Иванова**, К.Б. Шумаев**, ***, А.Л. Дудылина**, Э.К. Рууге*, **

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

***ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2021 г. После доработки 16.04.2021 г. Принята к публикации 20.04.2021 г.

Одной из причин риска развития различного рода патологий считаются нарушения в функционировании митохондрий, которые могут быть обусловлены чрезмерным образованием токсичных форм кислорода и азота в состоянии окислительного стресса. Продукция этих активных форм в живых организмах происходит постоянно в результате действия ферментных систем, а также в ходе окислительно-восстановительных реакций, например, таких как катализируемые ионами железа реакции Фентона и Габера-Вейса. В литературе появляется все больше данных о связи метаболизма ферритина, активных форм кислорода, оксида азота и динитрозильных комплексов железа, а также о важной роли динитрозильных комплексов железа в механизмах антиоксидантной защиты. С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек, спектрофотометрии и полярографии проведено исследование прооксидантных и антиоксидантых свойств динитрозильных комплексов железа и ферритина в супероксидгенерирующих системах: митохондриях сердца и системе «ксантинксантиноксидаза». Показано, что динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают реакционноспособные свободные радикалы в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы. В этих условиях ферритин стимулировал разрушение динитрозильных комплексов железа. Полученные данные указывают на антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа и, напротив, прооксидантный эффект ферритина.

Ключевые слова: супероксидные радикалы, динитрозильные комплексы железа, ферритин, антиоксиданты, сердце, митохондрии, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302921040104

Образование активных форм кислорода (АФК) постоянно происходит в живых организмах в результате побочных реакций дыхательной цепи митохондрий и других окислительно-восстановительных процессов. Основными мишенями АФК являются органы с интенсивным метаболизмом и высоким энергетическим потреблением: скелетные мышцы, почки, печень и сердце. В кардиомиоцитах при увеличении внутриклеточной концентрации кислорода, в том числе при реоксигенации после гипоксии, и снижении энергетического метаболизма могут происходить

Сокращения: $A\Phi K$ — активные формы кислорода, ДHKЖ — динитрозильные комплексы железа .

значительные изменения редокс-потенциалов переносчиков электронтранспортной цепи митохондрий, что приводит к резкому возрастанию скорости продукции $A\Phi K$ [1].

Существенное значение для энергетического метаболизма и генерации свободных радикалов кислорода в биологических системах имеют ионы железа, их гемовые и негемовые комплексы. Ферритин — гетерополимер, состоящий из двух типов субъединиц-цепей: тяжелой (H) и легкой (L) — является основным депо железа у большинства живых организмов и может проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. В нормальных условиях поддерживается динамическое равновесие между выходом железа и его за-

пасанием в ферритине, что обеспечивает низкий уровень свободного железа, тем самым снижается выход $\mathbf{A}\mathbf{\Phi}\mathbf{K}$. Железо высвобождается из ферритина в результате восстановления $\mathbf{Fe}(\mathbf{III})$ до $\mathbf{Fe}(\mathbf{II})$ до $\mathbf{Fe}(\mathbf{II})$ донорами электронов, и это может происходить в ходе окислительного стресса при взаимодействии ферритина и $\mathbf{O_2^{\bullet-}}[2]$. Также железо высвобождается при протеолизе ферритина, однако эти процессы изучены недостаточно.

Еще одним ключевым участником метаболизма железа и оксида азота, а также антиоксидантной системы клеток могут быть динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), которые также являются одной из основных природных форм депонирования NO в организме животных и человека [3]. Известно, что в образовании нитрозильных комплексов железа способен участвовать ферритин [4, 5]. Включение ионов железа в ДНКЖ может снижать их реактивность как инициаторов реакций с $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , например, реакций Габера—Вейса и Фентона, а включение NO — ингибировать образование OONO $^-$.

Таким образом, представляется важным дальнейшее исследование взаимодействия ферритина, ДНКЖ и других доноров NO в условиях, моделирующих генерацию АФК в организме человека и животных. В данной работе с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек, спектрофотометрии и полярографии проведено исследование прооксидантных и антиоксидантых свойств ДНКЖ и ферритина в супероксидгенерирующих системах: митохондриях сердца и системе «ксантин—ксантиноксидаза».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение изолированных митохондрий. Митохондрии выделяли из сердца крыс стандартным методом дифференциального центрифугирования [6]. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре (0-4)°С. Сердце вырезали после анестезии крыс линии Wistar внутрибрюшинным введением уретана (1.8 г анестетика на кг массы животного) и помещали в охлажденную среду выделения (~4°С). Среда выделения содержала 70 мМ сахарозы, 220 мМ маннитола, 50 мМ HEPES, 1 мМ EDTA, pH 7.40-7.42. Предварительно измельченные ножницами и отмытые от крови кусочки сердца пропускали через сито из нержавеющей стали, далее гомогенизировали в течение двух-трех минут при соотношении «среда: ткань», равном 8: 1. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700 g, супернатант, содержавший митохондрии, фильтровали и центрифугировали 10 мин при 14000 g на центрифуге К-24 (ГДР). Осадок митохондрий суспендировали в среде выделения с 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Полученную суспензию митохондрий (30–70 мг белка/мл) хранили во льду.

Определение функциональной активности митохондрий. Скорость потребления кислорода митохондриальной дыхательной цепью определяли с помощью электрода Кларка на полярографе YSI 53 (Yellow Spring Instruments, Inc., США). Среда инкубации митохондрий для полярографических измерений содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 MM EGTA, 4 MM KH₂PO₄, 3 MM MgCl₂, рН 7.4; температура 25°С; концентрация белка 0.4-0.7 мг/мл. В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат в концентрации 4-5 мМ. При необходимости добавляли ротенон – ингибитор комплекса І дыхательной цепи, в концентрации 2 мкМ. Для определения дыхательного контроля, степени сопряженности электронного транспорта и окислительного фосфорилирования добавляли АДФ в концентрации 200-300 мкМ. Дыхательный контроль рассчитывали как соотношение скоростей поглощения кислорода в состоянии III (+АДФ) и состоянии IV (без АДФ).

Регистрация спектров ЭПР перехватчика супероксида TIRON и динитрозильных комплексов железа. Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП («КБСТ» БГУ, Беларусь). Реакционную смесь вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE SubLite-Wall (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Эту капиллярную трубку дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов, что обеспечивало доступ воздуха (21% O₂) к образцу в резонаторе спектрометра ЭПР.

Генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями изучали с помощью перехватчика («scavenger») супероксида TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфоната), переходящего при взаимодействии с $O_2^{\bullet -}$ в семихинонную форму [7]. Ранее нами было показано [8], что регистрация семихинона TIRON • с помощью ЭПР является удобным методом измерения скорости образования супероксида как модельными ферментативными системами, так и электронными переносчиками митохондрий сердца. При этом скорость генерации $O_2^{\:\raisebox{3.5pt}{\text{\circle*{1.5}}}}$ в реакционной смеси оказалась пропорциональной квадрату интенсивности сигнала ЭПР семихинонов TIRON $^{\bullet}$. При рН < 9 этот спектр представляет собой квартет, являющийся результатом взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами с константами СТВ $a(H_2) = 0.331 \text{ мТл и } a(H_6) = 0.178 \text{ мТл (рис. 1a)}.$

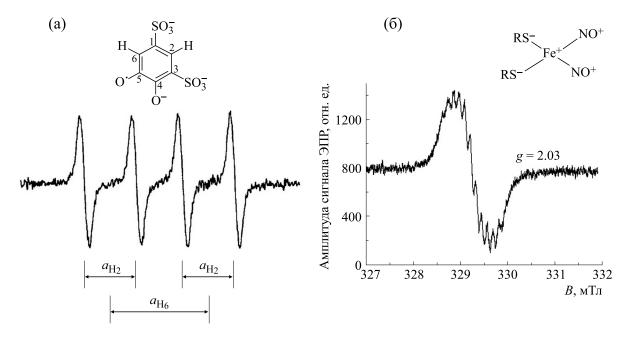


Рис. 1. (а) — Спектр ЭПР семихинонов TIRON в супероксидгенерирующей модельной системе «ксантин-ксантиноксидаза» в условиях, аналогичных условиям регистрации TIRON $^{\bullet}$ в митохондриальной суспензии (см. раздел «Материалы и методы»). (б) — Сигнал ДНКЖ в среде инкубации в отсутствие генерации АФК. Среда инкубации (в мМ): сахароза — 250, HEPES — 20, EGTA — 1, KH $_2$ PO $_4$ — 4, MgCl $_2$ — 3, pH 7.4; ДНКЖ — 700 мкМ.

Среда инкубации для измерений на спектрометре ЭПР содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 4 мМ KH₂PO₄, 3 мМ MgCl₂, 8 мМ сукцината, 5 мкМ антимицина A и 10 мМ TIRON; рН 7.4. Концентрация митохондрий в среде инкубации составляла ~4 мг/мл. Условия записи спектров ЭПР от TIRON • сослабление СВЧ-мощности 5—10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.05 мТл, СВ-частота ~9.32 ГГц, коэффициент усиления 500—1000, диапазон развертки 10 мТл. Выбор величины СВЧ-мощности и ВЧ-модуляции определялся требованием достижения максимальной чувствительности при неискаженной форме сигнала.

Запись спектров ДНКЖ производили при комнатной температуре (~25°С) в суспензии митохондрий сердца и системе «ксантин—ксантиноксидаза». Для получения парамагнитных моноядерных ДНКЖ к препарату диамагнитных биядерных комплексов добавляли необходимое количество цистеина (в небольшом избытке) и наблюдали характерный синглетный сигнал ДНКЖ с полушириной 0.7 мТл при $g_{\rm iso}=2.03$ (рис. 16). Под действием $O_2^{\bullet-}$ ДНКЖ разрушались, что вызывало постепенное уменьшение интенсивности сигнала ЭПР. Величину изменения сигнала ДНКЖ выражали отношением I/I_0 , где I_0 — амплитуда исходного (контрольного) сигнала ДНКЖ данной концентрации без генерации

АФК, I — интенсивность сигнала ДНКЖ в ходе эксперимента. Условия записи спектров ЭПР (для ДНКЖ): ослабление СВЧ-мощности 10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.2—0.4 мТл, коэффициент усиления 100—1000, диапазон развертки 5—10 мТл.

Определение скорости генерации супероксидных радикалов. Скорость генерации супероксидных радикалов в модельной системе «ксантинксантиноксидаза» измеряли на спектрофотометре Cary 60 (Agilent, Австралия) по реакции восстановления цитохрома с. Реакционная смесь содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ НЕРЕЅ, 1 мМ EGTA, 0,2 мМ ксантина, 0.1-200 мкг/мл ксантиноксидазы и 27 мкМ цитохрома c; рН 7.4. Реакцию запускали добавлением ксантина. В качестве контрольного образца использовали раствор того же состава за исключением ксантиноксидазы. За восстановлением цитохрома с следили по изменению разностного оптического поглощения при 550 и 557 нм. Молярный коэффициент экстинкции $-21.1\ 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ [9]. Скорость генерации $\mathbf{O}_2^{\:\raisebox{3.5pt}{\text{\circle*{1.5}}}}$ в ксантиноксидазной системе принимали равной чувствительной к SOD скорости восстановления цитохрома c.

Регистрацию спектров ЭПР спиновой ловушки TIRON в ксантиноксидазной системе проводили в условиях, аналогичных условиям регистрации в митохондриальной суспензии. Реакцию запускали добавлением ксантиноксидазы

 $(0.1-200 \ \mathrm{MKT/MJ})$ в реакционную смесь, содержащую $10 \ \mathrm{MM}$ TIRON и основные компоненты среды спектрофотометрических исследований, за исключением цитохрома c.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (ФРГ), Aldrich (США) и других. Синтез ДНКЖ происходил по способу, разработанному А.Ф. Ваниным [10]. ДНКЖ с глутатионом в диамагнитной димерной форме (5—10 мМ) получали, смешивая растворы $FeSO_4$ и глутатиона в молярном соотношении 1:2 сосуде Тунберга в атмосфере NO. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота (-196°C).

Статистический анализ. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в трех-пяти повторах. Для экспериментальных групп вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты по исследованию действия ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на генерацию $O_2^{\bullet -}$ проводили в модельной системе «ксантинксантиноксидаза» и в суспензии изолированных митохондрий из сердца крыс. Условия генерации супероксида в ксантин-ксантиноксидазной системе и в митохондриях были подобраны таким образом, чтобы получить сравнимые скорости генерации супероксида (интенсивность ЭПР сигнала TIRON в ксантин-ксантиноксидазной соответствовала ЭПР сигналу TIRON в суспензии митохондрий) [11]. Скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ составляла ~ 0.1 нмоль/мин на 1 мг белка. Использовали концентрацию ДНКЖ от 100 мкМ до 1.4 мМ. При увеличении концентрации ДНКЖ в среде инкубации в этих системах от 100 мкМ до 1.4 мМ наблюдали уменьшение интенсивности сигнала ЭПР TIRON. При концентрациях ДНКЖ меньше достоверного снижения ЭПР TIRON не происходило. Добавление 1.4 мМ ДНКЖ вызывало полное исчезновение сигнала ЭПР спиновой ловушки TIRON. Константа взаимодействия TIRON с $O_2^{\bullet-}$ составляет $10^6 10^7 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{c}^{-1}$ [12]. Так как глутатионовые ДНКЖ эффективно конкурируют с TIRON за супероксид, можно предположить, что эти соединения имеют сопоставимую константу взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$.

Действительно, константа реакции между $O_2^{\bullet-}$ и связанными с альбумином ДНКЖ составляет около $10^7~\mathrm{M^{-1}c^{-1}}$ [13]. Вместе с тем аналогичная константа для восстановленного глутатиона находится в пределах $10^2-10^3~\mathrm{M^{-1}c^{-1}}$ [14]. Также в работе [5] было показано, что глутатионсодержащие ДНКЖ намного более эффективно защищают эритроциты от гемолиза, вызванного гипохлоритом, чем свободный глутатион. Таким образом, антиоксидантные свойства ДНКЖ полностью не могут быть объяснены действием входящих в них тиолов.

Изменения интенсивности ЭПР ДНКЖ в супероксидгенерирующих системах представлены на рис. 2–5. При генерации $O_2^{\bullet -}$ как в суспензии митохондрий, так и в ксантинксантиноксидазной системе происходило уменьшение величины сигнала парамагнитных ДНКЖ (рис. 2а-в). В митохондриальной суспензии без добавления субстратов электронтранспортной цепи глутатионовые ДНКЖ оставались стабильными в течение 30 мин (данные не представлены). Падение сигнала этих ДНКЖ было на порядок больше в митохондриальной суспензии с сукцинатом и антимицином А, чем в отсутствие последнего. Действительно, известно, что антимицин А ингибирует третий комплекс электронтранспортной цепи (Q_{in} -центр цитохром- bc_1 комплекса), что приводит к многократному увеличению образования $O_2^{\bullet-}$ митохондриями [15]. Как видно из кинетики изменения сигнала ДН-КЖ (рис. 2в), в ходе генерации $O_2^{\bullet-}$ как в митохондриальной, так и в ксантин-ксантиноксидазной системах ДНКЖ разрушаются в течение 10— 15 мин.

Известно, что в митохондриях содержится митохондриальный ферритин (FtMt), а ${\rm O_2^{\bullet}}^-$ может вызывать высвобождение железа из ферритина [16]. Таким образом нельзя исключить, что цитозольные и митохондриальная изоформы ферритина могут быть источником ионов двухвалентного железа для образования ДНКЖ [4, 5]. Добавление в реакционную среду с митохондриями ферритина в концентрации от 1.14 до 4.54 мкМ приводило к увеличению скорости падения сигнала ДНКЖ (рис. 3). Поскольку ширина сигнала ДНКЖ при этом оставалась постоянной, уменьшение интенсивности сигнала, по-видимому, обусловлено разрушением ДНКЖ. На диаграммах (рис. 4а,б) видно, что увеличение концентрации ферритина приводит к ускорению падения сигнала ДНКЖ. Этот эффект может быть связан с выходом ионов Fe^{2+} из ферритина под действием $O_2^{\bullet -}$, что ведет к увеличению продукции АФК в

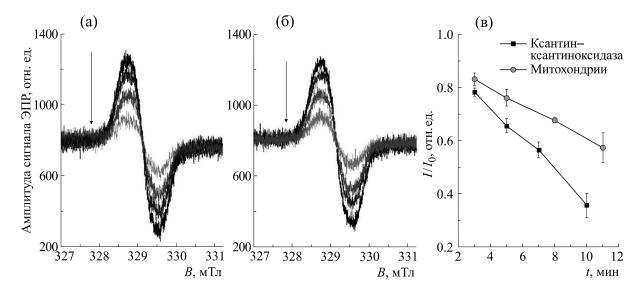


Рис. 2. Сигнал ДНКЖ в двух модельных системах: (а) — митохондрии (время 3, 5, 8, 11 мин); (б) — система «ксантин—ксантиноксидаза» (время 3, 5, 7, 10 мин). Исходная концентрация ДНКЖ — 700 мкМ, стрелкой указано изменение спектров в ходе реакции, время записи спектров с третьей до десятой-одиннадцатой минуты от момента добавления ксантиносидазы. (в) — Кинетика распада ДНКЖ в двух системах.

реакциях Фентона и Габера—Вейса и соответственно разрушению ДНКЖ. Распад ДНКЖ сопровождается высвобождением глутатиона и ионов железа, которые также могут участвовать в процессах свободнорадикального окисления. Так, глутатион, восстанавливая Fe³⁺, может способствовать как выходу железа из ферритина, так и стимулированию реакции Фентона. Свободный NO также может выделяться при распаде ДНКЖ, причем в реакции оксида азота с супероксидом образуется сильный окислитель пероксинитрит, способный разрушать ДНКЖ. Таким образом,

зависимая от $O_2^{\bullet -}$ деструкция ДНКЖ в присутствии ферритина может носить автокаталитический характер.

Сравнение влияние ферритина на деструкцию ДНКЖ в суспензии митохондрий и ксантинксантиноксидазной системе представлено на рис. 5. Видно, что в присутствии ферритина в суспензии митохондрий скорость распада ДНКЖ меньше, чем в супероксидгенерирующей системе, содержащей ксантин и ксантиноксидазу. Аналогичный эффект, различие в скоростях рас-

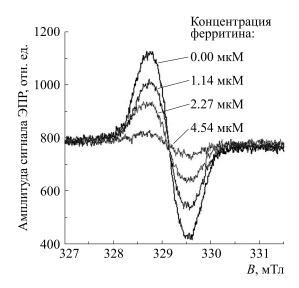


Рис. 3. ЭПР-спектр ДНКЖ (концентрация 700 мкМ) в суспензии митохондрий в присутствии различных концентраций ферритина. Время инкубации — 5 мин.

БИОФИЗИКА том 66 № 4 2021

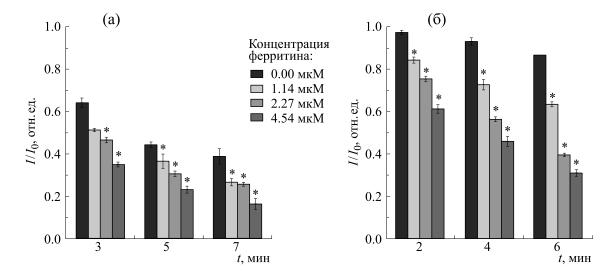


Рис. 4. Изменение относительной интенсивности сигнала ДНКЖ в присутствии разных концентраций ферритина: (а) — исходная концентрация ДНКЖ 350 мкМ, (б) — исходная концентрация ДНКЖ 1.4 мМ. * — Достоверное отличие по отношению к контролю (сигнал ДНКЖ в отсутствие ферритина).

пада ДНКЖ в этих системах, мы наблюдали без ферритина (рис. 2в). Можно предположить, что это замедление связано с ресинтезом ДНКЖ в митохондриях [5].

Для проверки роли $O_2^{\bullet -}$ в деструкции ДНКЖ были поставлены эксперименты с суперкоксидисмутазой. В ксантин-ксантиоксидазной системе добавление 500 ед./мл суперкоксидисмутазы приводило к уменьшению скорости разрушения

ДНКЖ до скорости самопроизвольного распада ДНКЖ. Добавление суперкоксидисмутазы в эту систему в присутствии ферритина вызывало снижение скорости разрушения ДНКЖ до значений, полученных в отсутствии ферритина (данные не приведены).

Таким образом, взаимодействия между АФК, ДНКЖ и ферритином можно описать следующим набором реакций:

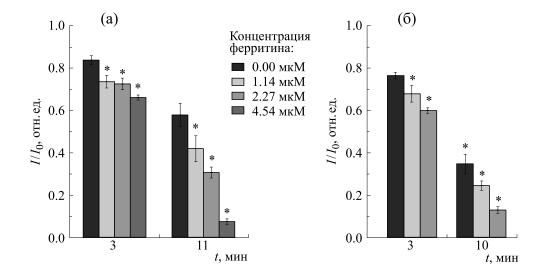


Рис. 5. Уменьшение величины сигнала ДНКЖ в присутствии различных концентраций ферритина в суспензии митохондрий и ксантин-ксантиноксидазной системе: (a) -4 мг/мл митохондрий, 80 мМ сукцината, 0.2 мМ антимицина A, 700 мкМ ДНКЖ; (б) -100 мМ ксантина, 0.1 мкМ ксантиноксидазы, 700 мкМ ДНКЖ. * - Достоверное отличие по отношению к контролю (сигнал ДНКЖ в отсутствие ферритина).

Митохондрии →
$$O_2^{*-}$$
 / Ксантин-ксантиоксидаза → O_2^{*-} (1)

$$O_2^{-} + ДНКЖ \rightarrow NO_3^{-}$$
, NO, GSSG, Fe²⁺ (2)

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+}$$
 (ферритин) $\rightarrow Fe^{2+}$ (3)

$$NO + O_2^{*-} \rightarrow ONOO^-$$
 (4)

$$ONOO^{-} \rightarrow NO_{2}^{\bullet} + OH^{\bullet}$$
 (5)

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$$
 (6)

$$Fe^{2+} + O_2^{-} + 2H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O_2$$
 (7)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$
 (8)

$$Fe^{2+}$$
 + глутатион + NO \rightarrow ДНКЖ (9)

На основании литературных данных [17] и проведенных ранее исследований [13] можно заключить, что ДНКЖ при взаимодействии с супероксидом превращается в комплекс, содержащий связанный пероксинитрит (рис. 6). Представляется вероятным, что координированный с железом ОNOO— далее окисляет глутатионовые лиганды, в результате чего комплекс распадается. Тем не менее нельзя исключить, что при избытке свободных тиолов или других доноров электронов комплекс с пероксинитритом может регенерироваться (восстанавливаться) до ДНКЖ.

Действительно, как показывают предыдущие исследования, выполненные в нашей лаборатории [18], в присутствии избытка глутатиона и цистеина пероксинитрит практически не влияет на разрушение ДНКЖ (рН 7.4). Но высокая антирадикальная активность (взаимодействие с супероксидом) ДНКЖ позволяет предположить, что в наших системах, по-видимому, не происходит образования свободного пероксинитрита.

Следует отметить, что в клетках NO, высвобождающийся при разрушении ДНКЖ под действием АФК, может снижать уровень ферритина [19]. Вместе с тем нитрозильный катион (NO⁺), по данным работы [20], может стимулировать синтез ферритина в мышиных макрофагах. В связи с тем, что ДНКЖ в зависимости от редоксусловий являются донорами как NO, так и NO⁺, влияние этих комплексов на уровень ферритина и свободного или «хелатируемого» железа может быть разнонаправленным.

Полученные данные о влиянии ферритина на кинетику распада ДНКЖ аналогичны описанному нами ранее действию метмиоглобина на деструкцию ДНКЖ в ксантин-ксантиноксидазной системе [21], тогда было показано, что скорость разрушения ДНКЖ увеличивается в присутствии метмиоглобина.

В ряде работ показано, что в условиях гипоксии в митохондриях происходит зависимый от

Рис. 6. Возможная схема взаимодействий динитрозильных комплексов железа с молекулярным кислородом и супероксидным радикалом.

нитрита или S-нитрозотиолов синтез ДНКЖ [5, 22, 23]. Считается, что нитрит и S-нитрозотиолы являются источниками NO, при взаимодействии которого с свободными ионами железа образуются ДНКЖ. Полагают, что с формированием ДН-КЖ связано цитопротекторное действие нитрита в ходе гипоксии-реоксигенации [21]. С другой стороны, если концентрация NO превышает содержание свободного (хелатируемого) железа, наблюдается дисфункция митохондрий, обусловленная разрушением железосерного кластера аконитазы [23]. Исходя из литературных данных и полученных нами результатов, можно предположить, что синтез ДНКЖ при низком парциальном давлении кислорода позволяет связать NO и ионы железа в митохондриях. При этом поступление железа из ферритина может предотвращать инактивацию аконитазы. Вместе с тем с началом реоксигенации накопленные ДНКЖ функционируют как антиоксиданты, перехватывая образующиеся АФК. Это предположение хорошо объясняет эффективное протекторное действие глутатионсодержащих ДНКЖ при ишемии и последующей реперфузии сердечной мышцы [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНКЖ с тиольными лигандами перехватывают супероксидные анион-радикалы, которые продуцируются митохондриями и в системе ксантин-ксантиноксидаза.

Показано, что в использованном диапазоне концентраций ферритин в этих моделях генерирования $O_2^{\bullet-}$ проявляет прооксидантные свойства, стимулируя разрушение ДНКЖ.

В суспензии митохондрий разрушение ДНКЖ в присутствии ферритина происходит медленнее, чем в ксантин-ксантиноксидазной системе. Этот факт может объясняться тем, что в этих условиях ДНКЖ либо не разрушаются полностью, либо происходит частичная регенерация комплексов.

События, происходящие в клетке при окислительном стрессе, зависят от продукции активных форм кислорода и азота, а также от уровня других редокс-активных соединений, в первую очередь ионов железа и тиолов. Полученные нами данные позволяют заключить, что митохондрии, тиолсодержащие ДНКЖ и ферритин являются ключевыми элементами, регулирующими баланс этих соединений. Прооксидантное действие ферритина в условиях генерации $O_2^{\bullet-}$ митохондриями и в системе ксантин-ксантиноксидаза согласуется с результатами, полученными ранее в других экспериментальных моделях. Подтверждены также антирадикальные свойства ДНКЖ. Нельзя исключить, что свободнорадикальные реакции с участием ДНКЖ и ферритина играют важную

роль в таком варианте программируемой гибели клетки, как ферроптоз.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 19-015-00444.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. M. N. Hughes, Biochim. Biophys. Acta **1411** (2–3), 263 (1999).
- 2. D. Finazzi and P. Arosio, Arch Toxicol. **88**, 1787 (2014).
- 3. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. 54, 15 (2016).
- 4. R. N. Watts and D. R. Richardson, Eur. J. Biochem. **269**, 3383 (2002).
- K. B. Shumaev, A. L. Dudylina, M. V. Ivanova, et al., Biofactors 44 (3), 237 (2018).
- 6. C. Frezza, S. Cipolat, and L. Scorrano. Nat. Protoc. 2, 287 (2007).
- 7. И. В. Григолава, М. Ю. Ксензенко, А. А. Константинов и др., Биохимия **45**, 75 (1980).
- 8. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Popova, et al., Biochem. Int. **13**, 391 (1986).
- 9. B. Vangelder, Biochim. Biophys. Acta 58, 593 (1962).
- 10. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide **66**, 1 (2017).
- 11. А. Л. Дудылина, Дис. ... канд. ф.-м.н. (МГУ, Москва, 2019).
- W. Bors, Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 582 (3), 537 (1979).
- K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide 18 (1), 37 (2008).
- 14. C. C. Winterbourn and D. Metodiewa, Arch. Biochem. Biophys. **314** (2), 284 (1994).
- N. Dairaku, K. Kato, K. Honda, et al., J. Lab. Clin. Med. 143 (3), 143 (2014).
- 16. D. W. Reif, Free Rad. Biol. Med. 12 (5), 417 (1992).
- 17. N. G. Tran, H. Kalyvas, K. M. Skodjet, et al., J. Am. Chem. Soc. **133**, 1184 (2011).

- 18. И. В. Заббарова, Дис. ... канд. ф.-м.н. (МГУ, Москва, 2004).
- D. R. Richardson, V. Neumannova, E. Nagy, et al., Blood 86 (8), 3211 (1995).
- 20. S. Kim and P. Ponka, Blood Cells Mol. Dis. **29** (3), 400 (2002).
- 21. И. В. Заббарова, К. Б. Шумаев, А. Ф. Ванин и др., Биофизика **49** (4), 659 (2004).
- P. Dungel, M. Perlinge, A. Weidinger, et al., Free Rad. Biol. Med. 89, 300 (2015).
- D. D. Thomas, C. Corey, J. Hickok, et al., Redox Biol. 15, 277 (2018).
- 24. O. Pisarenko, I. Studneva, A. Timoshin, et al., Pflugers Arch. **471** (4), 583 (2019).

Generation of Superoxide Radicals by Heart Mitochondria and the Action of Dinitrosyl Iron Complexes and Ferritin

V.A. Medvedeva*, **, M.V. Ivanova**, K.B. Shumaev**, ***, A.L. Dudylina**, and E.K. Ruuge*, **

**National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

***Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

One of the causes of the development of a wide range of pathologies is thought to be alterations in mitochondrial function, that may be due to the excessive generation of toxic forms of oxygen and nitrogen cumulating into oxidative stress. These reactive oxygen and nitrogen species in living organisms are generated continuously by enzymes and via oxidation-reduction processes, such as the Fenton reaction and iron-catalyzed Haber—Weiss reaction. In literature, there is much more data available on the relationship between the metabolism of ferritin, reactive oxygen species, nitric oxide and dinitrosyl iron complexes, as well as on the important role of dinitrosyl iron complexes in the antioxidant defense mechanisms. The prooxidant and antioxidant properties of dinitrosyl iron complexes and ferritin in superoxide-generating systems: heart mitochondria and the xanthine-xanthine oxidase system were studied using EPR spin trapping, by spectrophotometry, and polarography. It has been shown that dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands intercept reactive free radicals in systems simulating oxidative stress in cardiac muscle cells. Under these conditions, ferritin stimulated the destruction of dinitrosyl iron complexes. The data obtained indicate the antioxidant and antiradical effects of dinitrosyl iron complexes and, on the contrary, the prooxidant effect of ferritin.

Keywords: superoxide radicals, dinitrosyl iron complexes, ferritin, antioxidants, heart, mitochondria, electron paramagnetic resonance