

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ

ՄՈՂԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՍՈՆԱ ՄԿՐՏԻԶԻ ՖԵՍՉՅԱՆ

Ադրենալինով հարուցված հյուսվածքների բջիջների օքսիդատիվ վնասման մեխանիզմները և պաշտպանիչ գործոնները էքսպերիմենտում

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2016

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

Фесчан Сона Мкртичевна

Механизмы адреналин-индуцированного оксидативного повреждения клеток тканей и защитные факторы в эксперименте

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.00.04 – «Биохимия»

ЕРЕВАН 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիաթյանի անվան
Կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր պրոֆ. Մ.Ա.Սիմոնյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր պրոֆ. Գ. Ս. Վարդանյան

կենս. գիտ. դոկտոր պրոֆ. Պ. Ա. Ղազարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. հուլիսի 1 -ին, ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ
Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանություն
042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք.Երևան, Հասարայան փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գրադարանում և www.molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրը առաքվել է 2016 թ. մայիսի 31-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական

քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու՝



Գ. Ս. Սկրոչյան

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета Института биохимии
им. Г.Х. Бунятына Национальной Академии Наук РА

Научный руководитель: доктор биол. наук ,проф.Симонян М.А.

Официальные оппоненты: доктор биол. наук ,проф. Варданян Г.С.

доктор биол. наук, проф. Казарян П. А.

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита состоится 1-го июля 2016 г. в 15:00 часов на заседании Специализированного совета
042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА,
0014, Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
НАН РА и на сайте www.molbiol.sci.am.

Автореферат разослан 31-го мая 2016 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 042,

кандидат биол. наук

Մկրտչյան Գ. Մ.



ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. За счет продуцируемых активных форм кислорода (O_2^- , $HO\cdot$ и др.) изоформы NADPH оксидазы (Nox) регулируют иммунную систему, экспрессию гена, митохондриальное дыхание, пролиферацию и апоптоз клеток, кислородный гомеостаз и другие жизненно важные метаболические процессы [Bedard Ketal, 2007, Vignais P.V. 2002]. Регулирование активности этих ферментов является важным аспектом снижения фона оксидативного повреждения при различного характера патологических состояниях, включая адреналин-индуцированное оксидативное повреждение клеток тканей, в частности, кардиомиоцитов. В настоящее время чаще всего используется термин Nox вместо цитохром b_{558} [Carrichon L. et al., 2001; Kikuchi H. et al., 2010; Simonyan G. et al., 2011; Ostuni M. A., Campion Y. et al., 2009, Benna J. et al., 2008, Morel F., 2007; Paclet M. H. et al. 2007]. При этом сами продукты окисления адреналина (адренохром, аминокхромы) оказывают кардиотоксический эффект [Armarego W. L., et al, 1983]. Актуальность работы заключается в том, что в ней впервые на молекулярно-биохимическом уровне определены свойства (уровень, оптические спектральные показатели, активности, комплексообразования с гемоглобином и степени гемоглобин-индуцированного рилизинга) изоформ Nox из мембран клеток и клеточных компонентов тканей крыс, включая кардиомиоциты, под влиянием адреналина и продуктов его окисления в отсутствие и присутствии антиоксидантов неферментативного характера (L-аргинин, α -токоферол и селенат натрия) *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось комплексное определение молекулярно-биохимических механизмов воздействия адреналина и продуктов его окисления на уровень, активность и степень гемоглобин-индуцированного рилизинга из клеточных и субклеточных мембран изоформ Nox, под влиянием L-аргинина (L-Arg), α -токоферола (α -Тк) и селената натрия, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение механизмов взаимодействия изоформ Nox с адреналином *in vitro*.
2. Определение степени рилизинга NADPH оксидазы из клеточных компонентов тканей крыс и изменение активностей этого фермента под влиянием продуктов окисления адреналина *ex vivo*.
3. Выявление роли гемоглобина на процесс отщепления изоформ NADPH оксидазы из мембранных компонентов и экзосом сыворотки донорской крови.
4. Определение эффекта α -токоферола, L-аргинина и селената натрия на процесс рилизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов и мембран клеток и субклеточных компонентов, а также экзосом сыворотки крыс *ex vivo*.
5. Определение эффекта L-аргинина на гемоглобин-индуцирующий рилизинг NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс.
6. Определение активности, степени рилизинга и комплексообразования с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием подкожно введенного адреналина различной концентрации *in vivo*.
7. Определение уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием L-аргинина, α -токоферола и селената натрия *in vivo*.

Научная новизна работы. Было показано, что Nox из клеточных мембран и субклеточных компонентов тканей крыс (сердце, селезенка, печень, почки, легкие, а также ЭМ) и eNox из экзосом сыворотки крови окисляют адреналин в аденохром и далее аминокхромы, которые способны связываться с определенным участком (доменом) молекулы Nox, вызывая характерные необратимые изменения форм оптических спектров поглощения изоформ Nox, с подавлением (при избытке аденохрома) или стимулированием (при низких количествах аденохрома) NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-

восстанавливающей активностей изоформ Nox, которые могут считаться рецепторами адреналина. Скорее всего, увеличение аминокромами удельного содержания отщепленных из клеточных компонентов Nox, связано с индуцированием процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран клеточных компонентов, стимулирующих рилизинг Nox из этих мембран. Стимулирование аминокромами гемоглобин-индуцирующего отщепления Nox из клеточных компонентов, является новым механизмом дестабилизации клеточных компонентов *ex vivo* и *in vivo*. У млекопитающих Hb является фактором индукции отщепления eNox в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости кардиномы яичника женщин, путем образования нестабильного комплекса с eNox в составе локализованных в этих жидкостях экзосом с отщеплением eNox в растворимую фазу как *in vitro* так и *in vivo*. Путем нейтрализации O₂, перекиси водорода, соответственно HO•- радикалов, селенат натрия, L-Арг и α-Тк подавляют гемоглобин-индуцирующий рилизинг изоформ Nox из мембранных формирований кардиомиоцитов (аорты) *ex vivo*, вызывая необратимые оптико-спектральные изменения. Однако механизмы адреналин-индуцированного оксидативного повреждения биомембран клеток тканей и непосредственно Nox *in vitro* и *ex vivo* существенно отличаются от таковых *in vivo* при острой адреналиновой интоксикации крыс. В последнем случае повреждающий эффект оказывают гидроксильные радикалы. Путем нейтрализации супероксидов, использованные антиоксиданты неферментативного характера оказывают мембраностабилизирующий эффект, подавлением ПОЛ этих мембран и снижением гемоглобин-индуцированного рилизинга изоформ Nox из приведенных биомембран. При острой адреналиновой интоксикации крыс эффективность регулирования приведенных показателей, а также снижение числа гибели животных выше под влиянием введенных L-Арг, затем α-Тк и далее селената натрия. Это является новым механизмом мембраностабилизирующего эффекта приведенных антиоксидантов.

Научно-практическое значение работы. Предложенные методы получения Nox из клеточных мембран и мембран субклеточных компонентов могут быть использованы для определения количественных характеристик оксидативного повреждения этих тканей, ассоциированных с характерными изменениями уровня и активностей изоформ Nox и eNox, после воздействия адреналина *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Диапазон этих изменений в крови и других тканей может быть использован в качестве новых и чувствительных маркеров определения допустимых границ воздействия адреналина в экспериментальной биохимии и клинике. Явление окисления адреналина изоформами Nox и eNox *in vitro*, с характерными необратимыми изменениями формы оптических спектров и активности этих ферментов может служить чувствительным маркером адреналиновой интоксикации. Проникновение продуктов окисления адреналина (аминокромы) через биомембраны и стимуляция процесса рилизинга изоформ Nox из мембран клеточных компонентов является новым механизмом дестабилизации мембран клеточных компонентов тканей крыс *ex vivo*. При этом продукты окисления адреналина стимулируют гемоглобин-индуцирующий рилизинг изоформ Nox из биомембран. Это является новым механизмом мембранодестабилизирующего эффекта адреналина и гемоглобина *ex vivo*. Повреждающие эффекты адреналиновой интоксикации при подкожном введении адреналина ассоциированы с повышением уровня HO•-радикалов, которые деградируют изоформы Nox *in vivo*. L- Арг, α-Тк и селенат натрия могут быть применены в хирургии при соединении поврежденных тканей для стабилизации мембран поверхностных клеток, путем подавления гемоглобин-индуцирующего рилизинга. Полученные результаты по новому оценивают обоснование для использования L- арг, α-Тк и селенат натрия при адреналин-индуцированном оксидативном повреждении кардиомиоцитов и других типов клеток.

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены в ученом совете Института биохимии им. Г.Х.Бумятяна НАН РА (2015г.), годовой в отчетной научной сессии ЕГМУ им. Мхитара Гераца (2014г.), а также на совместном заседании кафедры биохимии и мед. биологии (2014г.).

Публикации. Основные результаты настоящего исследования отражены в 10 научных работах, опубликованных в отечественных изданиях .

Объем и структура работы. Работа изложена на 130 страницах, содержит 11 таблиц и 35 рисунков, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов и материала исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 194 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые методы. Для выделения и очистки Nox из эритроцитарных мембран, мембран клеток и субклеточных компонентов тканей (сердце, печень, почки, легкие), а также из экзосом сыворотки крови и асцитной жидкости были использованы лицензированные методы (Симонян М.А. и др., 1997; Симоняна Г.М. и др., 2001; Симонян Р.М. и др., 2014). Количество используемых крыс 90 (белые крысы массом тела 240 г., самцы). Доза введенного адреналина 2мг/кг, α -Тк 50 мг/кг, L- Арг 4 мг/кг, селенат натрия 5 мг/кг .

Выделение и очистка Nox из мембран клеток, мембран внутриклеточных компонентов тканей крыс и эритроцитарных мембран .Nox из водных смесей мембран клеток селезенки (МКС), сердечной ткани (МКСТ), костного мозга (МККМ), печени, почек, легких, аорты сердца и эритроцитарных мембран (ЭМ) а также из плазматических мембран цитозоля выделяли и очищали приведенными способами. Очищенные мембраны смешивали с водой (1:5 об/об) и повторно гомогенизировали в аналогичном режиме. После солюбилизации фракций изоформ Nox из очищенных мембран при pH 9,5, удаления нерастворимых осадков центрифугированием (при 10.000 об/мин, 20 мин) и диализа надосадочных растворов против воды фракции Nox подвергали ионообменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой KM-52, уравновешенной 0,004 М калий фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4. Не задержавшиеся на колонке с KM-52 белковые фракции далее подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52. После промывания колонки сначала водой, а затем - 0,01 М КФБ, изоформы Nox из колонки DE-52 элюировали 0,2 М КФБ. После гель-фильтрации этих Nox на колонке с сефадексом G100, центральная фракция имела электрофоретически гомогенное состояние (об этом свидетельствует наличие единой окрашенной белковой полосы на 10% полиакриламидном геле).

Выделение экстрацеллюлярной Nox из экзосом сыворотки крови крыс и асцитной жидкости карциномы яичника женщин. После инкубации очищенной от следов эритроцитов и плазменных клеток сыворотки крови (СК) и асцитной жидкости яичника женщин в течение 4-х суток при 4°C их подвергали диализу против воды. После центрифугирования диализата (10.000 об/мин, 10 мин) и удаления из надосадочного раствора липопротеина высокой плотности – супрола [Симонян М.А. и др., 1996], повторным центрифугированием супернатанта при pH 5,6 фракцию экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) выделяли ионообменным хроматографированием надосадочного раствора на сефадексе DEAE A-50. Из этой колонки фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ. Далее, после разбавления элюата водой (в 20 раз) и ионообменного хроматографирования на колонке с целлюлозой DE-52, фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ. Путем гель фильтрации фракции eNox на колонке с сефадексом G100, центральная фракция имела электрофоретически гомогенное состояние. Уровень Nox определяли путем измерения характерной для Nox (цитохрома b_{558}) оптической плотности при 530 нм (β полоса

поглощения). Удельное содержание Nox из мембран клеток тканей, включая МКС, МКСТ, МККМ, ЭМ и eNox определяли из расчета на 1 мл раствора Nox, полученного из 1 г тканей, 1 мл сыворотки и 1 мл эритроцитов.

Определение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox. NADPH зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, путем вычисления процента образующегося формазана при 560 нм в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей активности Nox принимали количество белка (плотность оптического поглощения β -полосы Nox при 530 нм), которое стимулирует образование формазана на 50%. Удельная NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки или 1 г тканей.

Определение ферригемоглобин-восстанавливающей активности изоформ Nox. ФерриHb-восстанавливающую активность изоформ Nox определяли используя свежеполученный ферриHb цитоплазмы эритроцитов крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения (α -полоса поглощения) при $A_{565}=0,8$ (оптическая единица). Непосредственно в кварцевые кюветы спектрофотометра к 3 мл раствора ферриHb добавляли 0,2 мл Nox (цит b_{558}) с $A_{530}=0,3$. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 30°. Далее, после повторного перемешивания реакционной смеси определяли кинетику восстановления ферриHb до ферроHb, путем измерения снижения плотности α -полосы поглощения ферриHb при 565 нм (это прямо пропорционально количеству образующегося ферроHb при A_{555}). За единицу ферриHb-восстанавливающей активности NADPH оксидазы принимали количество белка, вызывающего снижение плотности максимального оптического поглощения α -полосы ферриHb величиной до 0,05 оптических единиц в течение часа при 20°. Удельную ферриHb-восстанавливающую активность Nox была определена в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 мл сыворотки и 1 г тканей [Simonyan G.M. et al, 2006].

Определение СОД-миметической активности селената натрия методом восстановления НТС супероксидными радикалами. СОД-миметическую активность Na_2SeO_3 определяли НТС методом, путем вычисления процента подавления образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- -дисмутирующей активности селената принимали количество этой соли, которое подавляет образование формазана на 50%.

Определение СОД-миметической активности селената натрия методом обесцвечивания КБС супераксидными радикалами. СОД-миметическая активность селената натрия была определена и методом обесцвечивания кумасси бриллианта синего (КБС). Суть этого метода заключается в следующем. После добавления к раствору перекиси водорода (200 мкМ) КОН до pH 8-8,2 и инкубирования раствора при комнатной температуре в течение 20-25 мин, образуются O_2^- с характерными ЭПР спектром (с фактором Ланде – 2,2). Эти O_2^- ферментативно дисмутируются изоформами СОД. С другой стороны генерированные O_2^- обесцвечивают (восстанавливают) КБС, а СОД подавляет этот процесс. Путем вычисления степени подавления (50%) скорости обесцвечивания КБС супероксидами определяется антиоксидантная активность селената натрия.

Используемые материалы. Для выделения и очистки изоформ Nox были использованы целлюлозы DE-52, KM-52, («Whatman», Англия), сефадексы DEAE A-50 и G-100 («Pharmacia», Швеция). Для определения супероксиддисмутазной или супероксидпродуцирующей активности исследуемых веществ были использованы НТС,

ФМС, пирофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH, а также КБС и перекись водорода. Электрофорез белков был осуществлен на приборе венгерского производства с соответствующими реактивами и приспособлениями. Был использован адреналин фирмы "Sigma". Остальные реактивы были маркой с «чистый для анализа».

Используемые приборы. Для проведения ионообменной хроматографии были использованы стеклянные колонки со стеклянными фильтрами, размерами: 4x30 см и 2x20 см, а для гель-фильтрации 3x90 см и 2x70 см. В ходе работ были использованы центрифуги К-70, К-24, а также спектрофотометр "SpecordUV/VIS" германского производства и «Hitachi 2000», японского производства, с длиной оптического пути 1 см. Для размельчения ткани был использован стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности „р”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменения их активностей и форм оптических спектров поглощения *in vitro*. В результате взаимодействия адреналина (50 мкМ) с 50 мкМ электрофоретически гомогенными Nox из сыворотки крови (eNox), МКСТ, МККМ, МКС и ЭМ и инкубирования при 4° в течение 6 ч наблюдается определенное изменение формы и интенсивности поглощения этих Nox (рис.1). Эти изменения обусловлены эффектом налажения плотности оптического поглощения Nox и адренохрома, как это показано на рис.2, на примере Nox из ЭМ (остальные Nox претерпевают аналогичные изменения). Эти результаты свидетельствуют о том, что изоформы Nox и eNox способны окислять адреналин до адренохрома. Более того, взятым от адреналина электроном (как дополнительный источник электрона, наряду с NADPH) приведенные NADPH оксидазы, видимо, восстанавливают O₂ превращая его в O₂, а последние уже способны окислять адреналин до адренохрома, далее в аминокрома. Фактически это является механизмом активации Nox адреналином при продуцировании O₂.

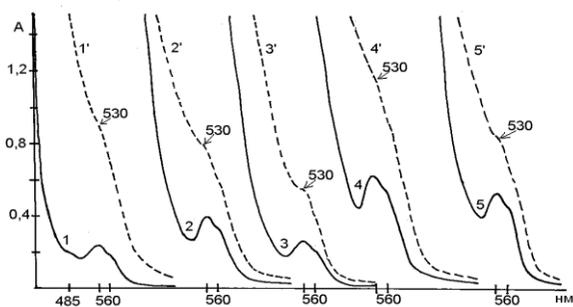


Рис.1. Оптические спектры поглощения Nox и eNox (50 мкМ) из: СК (eNox), до (1) и после 6 ч инкубации с 50 мкМ адреналином при 4° (1'), то же самое для Nox из МКСТ (2, 2'), из МККМ (3, 3'), МКС (4, 4') и ЭМ (5, 5') до проведения ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. А – адсорбция (плотность оптического поглощения).

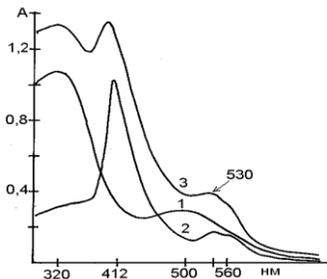


Рис. 2. Оптические спектры поглощения адренохрома (1) и Nox, на примере Nox из ЭМ (2) и после их смешивания и инкубации в течение 30 мин при 20° (3).

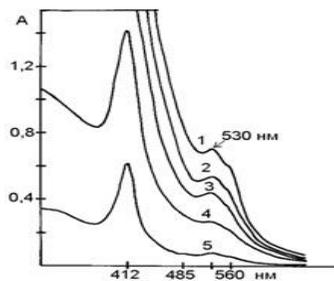


Рис. 3. Оптические спектры поглощения Nox и eNox (50 мкМ) после 6 ч инкубирования с 50 мкМ адреналином при 4°, с последующим диализом против воды, ионообменным хроматографированием на целлюлозе ДЕ-52, гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 и концентрирования на ДЕ-52.

После ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ-52 и гель-фильтрации Nox и eNox на сефадексе G100 искаженность оптических спектров этих ферментов или наложение спектров адренохрома или аминокхрома и Nox несколько сохраняется (рис.3). Однако, даже после удаления избытка адренохрома NADPH зависимая O₂-продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности несколько подавляются у Nox из ЭМ, МКС и МККМ, МКСТ и eNox с искаженной формой оптического спектра (рис.3, табл.1).

Таблица 1

Изменения NADPH зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox (50 мкМ) после их инкубации с 50 мкМ адреналина при 4° в течение 6 ч, диализа против воды, ионообменного хроматографирования на целлюлозе ДЕ-52 и гель-фильтрации на сефадексе G100 (p < 0,05, n=6).

Nox из:	NADPH зависимая O ₂ - продуцирующая активность		ферриHb-восстанавливающая активность	
	К	+ адреналин	К	+ адреналин
ЭМ	14,6±2,3, p=0,03	6,6± 0,4, p=0,02	9,1± 0,6, p=0,04	4,1± 0,1, p=0,03
МКС	16,2±1,6, p=0,04	12,3±1,5, p=0,02	12,5±1,4, p=0,01	9,5±1,1, p=0,04
МККМ	18,5± 2,2, p=0,03	13,4±1,7, p=0,04	14,6±2,7, p=0,03	10,5±0,7, p=0,03
МКСТ	17,0±3,1, p=0,01	14,7±2,0, p=0,02	16,1±2,4, p=0,03	13,1±1,4, p=0,01
СК (eNox)	22,3±2,4, p=0,03	16,1±2,6, p=0,03	19,3±2,2, p=0,03	13,1±2,1, p=0,01

* примечание: активность определена в расчете на 1 г ткани (единица/грам).

Адреналин в низких концентрациях (5 нМ) активирует O₂⁻-продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox, а в избытке (50 нМ) он подавляет их (возможно адренохром играет роль блокатора для Nox). Таким образом изоформы приведенных Nox окисляют адреналин в адренохром, который способен концентрационно зависимым способом необратимо связываться с определенным участком (доменом) молекулы Nox и изменить активности этих ферментов.

2. Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминокхромами *ex vivo*. После инкубации водных смесей ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, из МККМ, ядер клеток сердечной ткани (ЯКСТ), мембран клеток

сердечной ткани (МКСТ) и митохондрий клеток сердечной ткани (МИКСТ) и сыворотки крови с 50 мкМ адреналином (ОП пробы Nox) и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М ферриНв при pH7,4-8 ex vivo осуществлено выделение изоформ Nox из этих проб и К-проб (в отсутствии адреналина). Было показано, что по сравнению с Nox К-проб наблюдается необратимое изменение формы оптических спектров и увеличение степени отщепления изоформ Nox ОП проб, даже после проведения их гель фильтрации и диализа. Однако эта закономерность не наблюдается у eNox (табл. 2-4).

Таблица 2

Удельное содержание (плотность максимального оптического поглощения β -полосы при 530 нм) фракции Nox в К и ОП пробах, после их диализа против воды до проведения ионообменной хроматографии отщепленных из них Nox (n = 6, p < 0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	0,09±0,01, p=0,001	0,04±0,006, p=0,01	↓55,4±4,9
ЭМ	0,4± 0,03, p=0,0001	1,0±0,07, p=0,03	↑150,0±32,8
МКС	3,7±0,2, p=0,02	0,4±0,01, p=0,001	↑10,8±0,4
ЯКС	4,8±0,5, p=0,002	6,0±0,5, p=0,01	↑25,0±3,6
МИКС	0,75±0,06, p=0,001	1,44±0,1, p=0,01	↑92,0±7,1
ККМ	36,0±7,1, p=0,004	75,0±3,7, p=0,002	↑108,3
ЯКСТ	2,2±0,1, p=0,002	2,0±0,4, p=0,006	↓9,1±0,1
МКСТ	0,13±0,02, p=0,001	0,23±0,01, p=0,002	↑76,9±6,9
МИКСТ	0,12±0,02, p=0,006	0,26±0,01, p=0,01	↑116,6±13,4

Однако по сравнению с показателями К проб ферриНв-восстанавливающая активность Nox ОП-проб в гомогенной фазе снижена сравнительно больше, чем в гетерогенной фазе (табл.3).

Таблица 3

Удельная NADPH зависимая O₂-продуцирующая активность Nox К и ОП проб в гомогенной фазе после их диализа против воды (n = 6, p < 0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	16,0±1,7, p=0,002	13,7±1,2, p=0,002	↓14,4±1,4
ЭМ	11,1±1,6, p=0,001	44,2±5,2, p=0,005	↑298±37,5
МКС	28,3±3,2, p=0,001	16,2±2,5, p=0,0001	↓42,8±5,5
ЯКС	33,7± 4,0, p=0,001	18,6±2,7, p=0,0002	↓44,8±5,6
МИКС	21,9±3,0, p=0,007	14,7±2,8, p=0,004	↓32,9±4,9
МККМ	887,0±23,7, p=0,002	1596,4±101,3, p=0,001	↑79,8±5,8
ЯКСТ	194,3±32,3, p=0,003	170,4±21,0, p=0,004	↓12,4±1,1
МКСТ	13,8±1,1, p=0,008	47,3±5,0, p=0,002	↑242,7±23,8
МИКСТ	24,5±3,7, p=0,001	38,3±5,1, p=0,004	↑56,3±6,8

Таблица 4

Удельная ферриНв-восстанавливающая активность Nox К и ОП проб, после диализа этих ферментов против воды в гомогенной фазе (n = 6, p < 0,05).

Источники Nox	К	ОП	Разница, %
Сыворотка крови	31,5±4,0, p=0,001	31,8±3,8, p=0,002	0
ЭМ	42,4±5,5, p=0,004	26,2±3,2, p=0,002	↓38,3±4,7
МКС	38,7±4,4, p=0,0002	21,3±3,0, p=0,001	↓45,1±5,1
ЯКС	40,9±4,6, p=0,003	26,7±2,0, p=0,001	↓34,7±3,1
МИКС	22,3±3,0, p=0,01	6,3±0,2, p=0,002	↓71,7±6,4
ККМ	1488,3±101,6, p=0,001	640,4±38,9, p=0,005	↓57,0±5,9
ЯКСТ	89,2±8,1, p=0,002	19,0±2,1, p=0,004	↓78,7±6,8
МКСТ	41,4±6,3, p=0,002	23,8±2,9, p=0,0003	↓57,4±6,6
МИКСТ	85,7±7,7, p=0,002	31,1±2,9, p=0,001	↓62,6±7,2

Таким образом сходство аминоксенов к Nox из ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ и МККМ различное, из-за чего, оптико-спектральные свойства и активности изоформ Nox подвергаются различным изменениям. Следовательно в результате инкубации (при 4⁰, в течение 24 ч, pH 7,4-8) относительно высоких доз адреналина (50 мкМ) с ЭМ, МКС, ЯКС, МИКС, ККМ, МКСТ, МИКСТ, ЯКСТ и сыворотки крови *ex vivo* наблюдаются неадекватные изменения уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox.

3. Роль гемоглобина в процессе рилизинга экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин.

Плотность характерного максимального оптического поглощения eNox из экзосом асцитной жидкости карциномы яичника женщин с давностью заболевания 1,2 и 3,5 года составляла 0,12±0,01 и 0,3±0,01 соответственно (p<0,05, n=6). По оптическим спектральным показателям, в окисленном и в восстановленном дитионитом натрия состояниях, полученные изоформы eNox из экзосом сыворотки донорской крови и асцитной жидкости практически не отличаются от NADPH оксидаз (Nox), выделенных и очищенных из ЭМ, МКС, ЯКС, МККМ крыс, на примере Nox из МКС (оптические спектры Nox из приведенных клеток практически идентичны с Nox из МКС и отдельно не приводятся), как это показано на рис. 4 – а,б. При этом увеличение уровня eNox имеет дозозависимый характер от концентрации гемоглобина(рис 5).

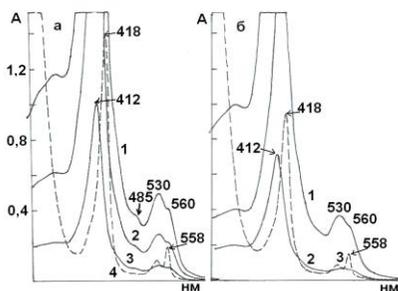


Рис. 4. Оптические спектры поглощения eNox: а – в окисленном состоянии, из асцитной жидкости карциномы яичника женщин с давностью заболевания 3,5 года (1) и 1,2 года (2);

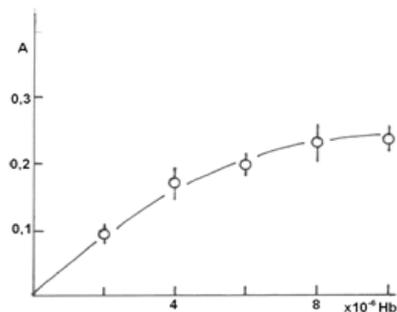


Рис. 5. Изменение плотности поглощения eNox из сыворотки донорской крови человека, после инкубирования сыворотки с

после разбавления последнего 0,04 М КФБ (3) и восстановления дитионитом натрия (4). б - спектры Nox из клеточных компонентов селезенки, костного мозга и эритроцитарных мембран крыс в окисленном состоянии (на примере Nox из мембран клеток селезенки); после разбавления последнего (2) и восстановления дитионита натрия (3).

различными количествами Hb при 4° в течение 4-х дней. eNox растворены в 0.04 М КФБ.

Однако, в отличие от этих Nox на оптическом спектре eNox имеется небольшое, но характерное для eNox поглощение при 485нм (рис.4-а). Эффективное количество Hb для отщепления eNox *in vitro* составляет до 85 мМ. При этом эти eNox имеют высокую резистентность против перекиси водорода.

Таким образом, Hb вызывает релизинг eNox из экзосом сыворотки крови и асцитной жидкости яичника женщин как *in vitro*, так и *in vivo*. Скорее всего Hb играет роль «скавенджера» eNox.

4. Подавление селенатом натрия релизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомиоцитов крыс *ex vivo*. Селенат натрия в концентрационно-зависимой манере подавляет обесцвечивание КБС (рис.6,7), снижается плотность максимального оптического поглощения этого красителя при 580 нм, проявляя этим антиоксидантную активность ($503 \pm 32,8$ ед, $p < 0,05$). При этом толерантность селената натрия против перекиси водорода и гидроксильных радикалов (они образуются при неферментативном расщеплении перекиси водорода [Simonyan M.A. et al., 1979]) выше чем таковой у Cu,Zn-СОД. Это дало основание для использования селената натрия в процессе релизинга Nox из клеточных формирований кардиомиоцитов крыс *ex vivo*. Селенат натрия существенно подавляет отщепление изоформ Nox из мембран ядер, митохондрий и кардиомиоцитов крыс, при этом не изменяя форму оптических спектров поглощения изоформ Nox, а также их NADPH-зависимую O₂-продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности.

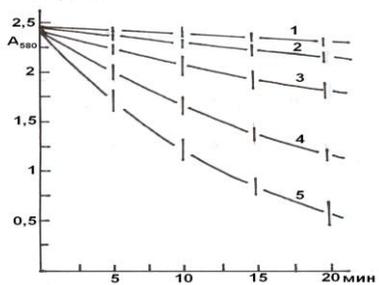


Рис. 6.

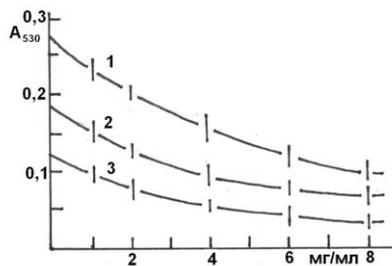


Рис. 7. Изменение интенсивности оптического спектра поглощения изоформ Nox (при 530 нм) полученной из мембран кардиомиоцитов (1), ядер (2) и митохондрий (3), после инкубации селената натрия с биомембранами в приведенных условиях.

Кинетические кривые снижения плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм при комнатной температуре под влиянием Cu,Zn-СОД, супероксидов и селената натрия. К 5 мл раствору КБС добавлена: 50 мкМ Cu,Zn-СОД и 0,1 мл раствора O₂, генерированные при расщеплении перекиси водорода (1). К раствору КБС одновременно добавляли: 0,1мл раствора O₂ и 4 мг/мл селената натрия (2), O₂ и 2 мг/мл селената натрия (3) и O₂ и 1 мг/мл селената

натрия (4) и после добавления к раствору КБС только O_2 (5).

После аэробного инкубирования при 4° в течение 4 дней селената натрия с мембранами кардиомиоцитов, ядер и митохондрий наблюдается концентрационно-зависимое от селената натрия (до 4 мг/мл) подавление рилизинга изоформ Nox. Подавление рилизинга селенатом натрия выше у Nox из мембран кардиомиоцитов, затем у Nox из мембран ядер и, наконец, из мембран митохондрий (рис.7). Путем нейтрализации супероксидов селенатом натрия подавляется рилизинг изоформ Nox из мембранных формирований кардиомиоцитов. Таким образом селенат натрия может играть мембраностабилизирующую роль, защищая кардиомиоциты от оксидативного повреждения, наблюдающегося, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях.

5. Стимуляция ферригемоглином рилизинга изоформ NADPH оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесс α -токоферолом и L-аргинином. В результате аэробной инкубации сыворотки крови и водных смесей мембран клеток, ядер и митохондрий кардиомиоцитов крыс при pH 8 в аэробных условиях, при 4° C в течение 4-х дней *ex vivo*, наблюдается рилизинг изоформ Nox и eNox (из экзосом сыворотки крови) в растворимую фазу. В этих условиях аналогичная направленность подавления степени рилизинга изоформ Nox из клеточных компонентов кардиомиоцитов и из экзосом сыворотки крови под влиянием α -Тк и L-Арг сохраняется (на примере Nox из мембран митохондрий), как это показано на рис.8.

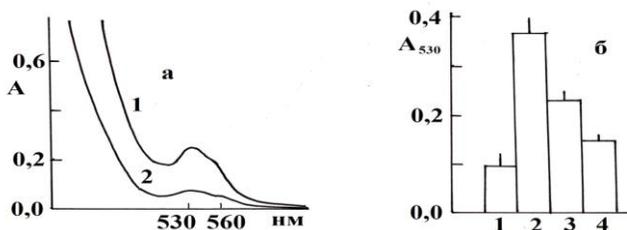


Рис.8. Оптические спектры поглощения Nox из водных смесей мембран, митохондрий кардиомиоцитов крыс после аэробной инкубации этих мембран в отсутствия и присутствия Hb, α -Тк и L-Арг (а) и изменение уровня Nox (расчетная удельная плотность β -поглощения при 530 нм) из водных смесей мембран митохондрий после их аэробной инкубации в отсутствия и присутствия Hb, α -Тк и L-Арг *ex vivo*(б): а-1 Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран митохондрий кардиомиоцитов после их аэробной инкубации при pH 8 в течение четырех дней при 4° C в присутствии 15 μ M ферриHb или ферриHb+ α -Тк (0,1 мг/мл) или ферриHb+ 0,15 мг/мл L-Арг *ex vivo*; а-2 Форма оптического спектра поглощения Nox, выделенной из водных смесей мембран митохондрий после их инкубации в аналогичных условиях в отсутствии приведенных агентов; б- Изменение удельного содержания Nox, выделенной из водных смесей мембран митохондрий в приведенных условиях при отсутствии приведенных агентов (1) и в присутствии 15x10⁽⁻⁶⁾ M ферриHb(2), ферриHb+ α -Тк (3) и ферриHb + L-Арг(4) в указанных количествах.

Причем, повышение степени рилизинга изоформ Nox происходит дозозависимой манере в отношении ферриHb с эффективной дозой последнего до 15 μ M.

Первым этапом рилизинга Nox является ПОЛ биомембран[AzziA. et al., 2007], облегчающего проникновение ферриHb и образование нестабильного комплекса с изоформ Nox локализованной в этих мембранах. Соответственно путем подавления ПОЛ α -Тк и L-Арг подавляют рилизинг изоформ Nox. Прием L-Арг и α -Тк более эффективно подавляют рилизинг Nox из мембран ядер, митохондрий, мембран кардиомиоцитов крыс и, наконец, из экзосом сыворотки. Таким образом при дестабилизации эритроцитов, проникающий в сыворотку гемоглобин может играть дестабилизирующую роль и в отношении мембран кардиомиоцитов, проявляя кардиотоксический эффект, а α -Тк и L-Арг могут проявить кардиопротекторный эффект. Таким образом подавление рилизинга изоформ Nox из клеточных компонентов, в частности кардиомиоцитов, является новым механизмом защиты этих клеток α -Тк и L-Арг.

6. Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс. В результате инкубации водного гомогената аорты сердца крыс с $15 \mu\text{M}$ ферриHb в отсутствии и присутствии 1 мг/мл L-арг при pH 7,4-8 и pH 10 в течение 2 дней при 4°C наблюдается рилизинг Nox из этих клеток. По оптико-спектральным показателям Nox из аорты сердца крыс практически не отличается от Nox выделенных из других клеточных формирований тканей крыс (селезенка, легкие и эритроциты). В этих условиях L-Арг подавляет отщепление Nox из клеток аорты. Удельная плотность максимального оптического поглощения отщепленной Nox в отсутствии L-Арг составляет $0,83 \pm 0,1 \text{ oe}$ ($p=,001, n=6$), а в присутствии L-Арг $0,44 \pm 0,05 \text{ oe}$ ($p=,001, n=6$). При этом, кислотно-основные характеристики Nox из мембран клеток аорты сердца крыс не изменяются, по сравнению с другими типами Nox. Однако, NADPH зависимую O_2^- -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности фракции Nox из клеток аорты несколько снижены (на $10,7 \pm 1,2\%$ и $12,4 \pm 1,1\%$, соответственно) по сравнению с клеточными Nox из мембран вышеприведенных тканей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что за счет формирования нестабильного комплекса (ассоциата) между ферриHb и Nox, локализованной на поверхности клеток аорты сердца крыс, происходит отщепление Nox из гетерогенной фазы в гомогенную (растворимую) фазу. Подавление рилизинга Nox из мембран клеток аорты сердца L-аргинином (возможно это связано со стимуляцией активности каталазы L-аргинином *in vitro*) [Товмасян М.С. и др., 2008] свидетельствует о важной роли перекиси водорода, как важного агента индукции перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембран клеток аорты. Фактически L-Арг является стабилизирующим фактором клеток аорты сердца крыс.

7. α -Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс. В результате инкубации водного гомогената костного мозга, мембран клеток и субклеточных компонентов селезенки, миокарда, ЭМ и сыворотки крови крыс с $15 \mu\text{M}$ ферриHb в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α -Тк, при pH 7,4-8 и pH 10 в течении 2 дней при 4°C , наблюдается рилизинг изоформ Nox из приведенных биосистем и подавление этого рилизинга α -Тк различными степенями (табл.5,6).

Таблица 5

Плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) отщепленных изоформ Nox из мембран клеток и субклеточных формирований крыс после их инкубации при 4° в течение 2 дней с перемешиванием в отсутствие (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α -Тк при pH 7,4-8 ($p < 0,05, n=6$).

Изоформы Nox из	К	ОП
МК миокарда*	$0,16 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,004$
МЯК миокарда	$0,25 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,007$
МТК миокарда	$0,08 \pm 0,005$	$0,06 \pm 0,008$

ЭМ	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,003
Клеток костного мозга	4,20 ± 0,7	2,6 ± 0,8
МК селезенки	0,90 ± 0,07	0,63 ± 0,04
МЯК селезенки	0,60 ± 0,03	0,45 ± 0,02
МТК селезенки	0,42 ± 0,3	0,28 ± 0,06
Сыворотки крови (eNox)	0,32 ± 0,04	0,19 ± 0,02

**Примечание: МК - мембраны клеток, МЯК - мембраны ядер клеток, МТК - митохондрии клеток, ЭМ – эритроцитарные мембраны.*

Таблица 6.

Плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) отщепленных изоформ Nox из мембран клеток и субклеточных формирований крыс после их инкубации при 4° в течение 2 дней с перемешиванием в отсутствии (К) и присутствии (ОП) 1 мг/мл α-Тк при рН 10,5 (p<0.05, n=6)

Изоформы Nox из:	К	ОП
МК миокарда*	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,008
МЯК миокарда	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,009
МТК миокарда	0,12 ± 0,006	0,08 ± 0,01
ЭМ	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,01
Клеток костного мозга	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,07
МК селезенки	0,83 ± 0,05	0,60 ± 0,05
МЯК селезенки	0,72 ± 0,03	0,52 ± 0,04
МТК селезенки	0,80 ± 0,05	0,64 ± 0,02

**Примечание: МК - мембраны клеток, МЯК - мембраны ядер клеток, МТК - митохондрии клеток, ЭМ – эритроцитарные мембраны.*

Исходя из приведённых данных, можно констатировать, что антиоксидант α-Тк является сквенджером гидропероксильных радикалов (НО₂[•]), путем их улавливания подавляет ПОЛ и соответственно рилизинг изоформ Nox. Таким образом мембраностабилизирующий эффект α-Тк связан не только с подавлением ПОЛ мембран, но и с соответствующим подавлением рилизинга Nox и eNox, которые являются ключевыми, структурно-функциональными компонентами приведенных мембран клеток и субклеточных образований. В следующей серии экспериментов было определено воздействие экзогенно введенного адреналина на уровень и активность изоформ Nox из биомембран.

8. Активность, комплексообразования с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из клеточных образований тканей крыс под влиянием адреналина различной концентрации. С увеличением доз подкожно введенного адреналина повышается число гибели животных (до 25%), что свидетельствует о критическом состоянии организма животных. Через 4ч динамика снижения уровня отщепленных изоформ Nox из мембран клеточных компонентов (сердца, легких, печени, почек и ЭМ) практически одинаковая (рис.9), (на примере показателей мембран клеточных компонентов сердца). Наоборот, наблюдается увеличение уровня отщепленной eNox из экзосом сыворотки (рис.10).

Это свидетельствует о повышенном противодействии eNox против продуктов окисления адреналина и перекиси водорода in vivo. После гель-фильтрации на сефадексе G-100 иконцентрирования изоформ Nox, выделенных из приведенных биосистем, искаженность формы оптических спектров несколько сохраняется.

Таким образом при адреналиновой интоксикации наблюдается снижение степени комплексообразования между ферриНв и Nox, с увеличением их супероксид-продуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активностей (до 22%) при низких концентрациях и снижением этих активностей при повышенных концентрациях вводимого адреналина.

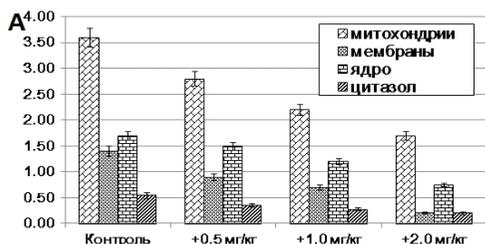


Рис. 9. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований сердца, через 4 ч после введения крысам адреналина ($p < 0,05$, $n=8$).

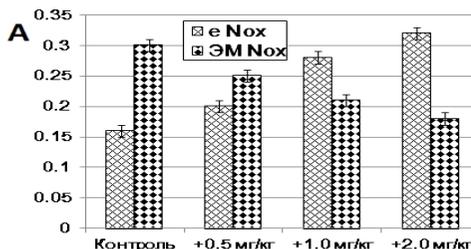


Рис.10. Удельное содержание изоформ Nox (расчетная удельная плотность оптического поглощения при 530 нм) из клеточных формирований экзосом сыворотки и из эритроцитарных мембран через 4 ч после введения крысам адреналина $p < 0,05$, $n=8$).

Однако, с увеличением доз вводимого адреналина, наблюдается соответствующее снижение удельного содержания отщепленных изоформ Nox из клеточных формирований тканей, как результат увеличения уровня $\text{HO}\cdot$ -радикалов, которые деградируют Nox.

9.Регулирование уровня и активности изоформ NADPH оксидазы клеточных компонентов крыс, при острой адреналиновой интоксикации, под влиянием введенных L-аргинина, α -токоферола и селената натрия. Через 20 мин после подкожно введенного адреналина (2мг/кг), животным отдельных групп вводили α -Тк (50 мг/кг), 4 мг/кг L-Арг, 5 мг/кг селената натрия (приведены эффективные дозы этих соединений). Используемая доза подкожно введенного адреналина оказывают острый токсический эффект. Через 4 ч после введения адреналина гибель животных составляла $47 \pm 5,1\%$ ($p=,01$, $n=8$). Под влиянием введенных в отдельности α -Тк, L-Арг и селената натрия потеря животных составляла $25,5 \pm 3,2\%$, $11,4 \pm 2,1\%$ и $28,2 \pm 4,4\%$, $p=0,001$ 0,01 и 0,005 соответственно. В таком критическом состоянии организма у изоформ Nox, выделенных из мембран, ядер, митохондрий и цитозоля клеток органов животных (сердце, печень, почки и легкие), а также ЭМ, введенный адреналин вызывает некоторые необратимые изменения формы оптических спектров поглощения приведенных изоформ Nox, с фоновым увеличением плотности α - и β -полосы поглощения (560 и 530 нм), а также поглощение Core при 412 нм. С другой стороны, под влиянием введенного адреналина наблюдается соответствующее снижение удельного содержания отщепленных изоформ этих Nox и уровня ферриНв, входящего в комплекс с изоформами Nox из клеточных формирований тканей, как это показано на рис.11, на примере показателей Nox из клеточных и субклеточных компонентов сердечной ткани. Наблюдается соответственное снижение уровня комплекса ферриНв с изоформами Nox.

При этом уровень отщепленной экстрацеллюлярной Nox (eNox) из наноформирований (экзосом) сыворотки крови увеличивается, что свидетельствует о высокой толерантности eNox к продуктам окисления адреналина и воздействия перекиси водорода и в условиях *in*

in vivo (рис.12). Фактически эффективность регулирования уровня и активности изоформ Nox выше у L-Арг, далее α -Тк и селената натрия.

Рис.11. Расчетная удельная плотность изоформ Nox из митохондрий и мембран при 530 нм, ядер и цитозоли клеток сердечной ткани крыс, после введения 1 мл физраствора (ОГ-1); после подкожного введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α -токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α -Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла. Остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, ($p < 0,05$, $n = 8$).

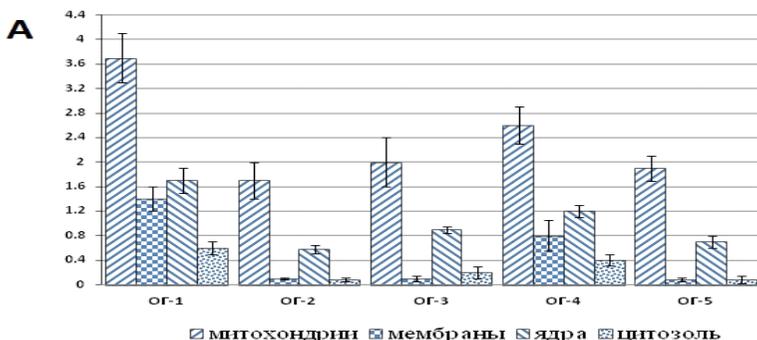
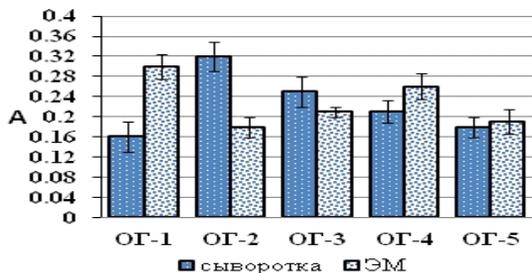


Рис.12. Расчетная удельная плотность при 530 нм изоформ Nox из сыворотки крови и ЭМ крыс, после подкожного введения 1 мл физиологического раствора (ОГ-1), после введения 2мг/кг массы животного адреналина (ОГ-2). Через 20 мин после введения адреналина было введено: 50 мг/кг α -токоферола (ОГ-3), 4 мг/кг L-аргинина, (ОГ-4), 5 мг/кг селената натрия (ОГ-5). α -Токоферол смешивали с 1 мл растительного масла, остальные соединения были растворены в 1 мл физраствора и введены животным подкожно, ($p < 0,05$, $n = 8$).



Таким образом, механизмы повреждающего действия адреналина и положительного эффекта приведенных антиоксидантов в указанных условиях *in vivo* существенно отличаются от таковых *in vitro* и *ex vivo*. Эти механизмы ассоциированы с увеличением (под влиянием адреналина) или снижением (под влиянием приведенных антиоксидантов) уровня НО•-радикалов, которые деградируют Nox, но не eNox.

ВЫВОДЫ

1.Продуцируемые O_2^- изоформами NADPH оксидазы (Nox) клеточных компонентов тканей крыс окисляют адреналин в адrenoхромы, далее в аминокхромы, которые вызывают необратимые изменения формы оптических спектров поглощения этих ферментов и в концентрационно зависимой манере повышают или подавляют NADPH зависимую O_2^- -продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox *in vitro*.

2.Дестабилизирующий эффект аминокхромов на мембраны клеточных компонентов тканей крыс обусловлен повышением перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран и увеличением степени рилизинга изоформ Nox *ex vivo*.

3.Индукирование гемоглобином (Hb) рилизинга изоформ Nox из экзосом сыворотки и асцитной жидкости карциномы яичника женщин обусловлено образованием нестабильного комплекса между гемоглобином и Nox *in vitro* и *in vivo*.

4.Мембраностабилизирующие эффекты L-аргинина, α -токогерола и селената натрия обусловлены подавлением ПОЛ и рилизинга изоформ Nox из мембран клеток и мембран субклеточных формирований тканей крыс *ex vivo*.

5.При острой адреналиновой интоксикации крыс окислительное повреждение мембран клеток и мембран субклеточных компонентов клеток тканей ассоциированы с иницированием ПОЛ этих мембран супероксидными и гидроксильными радикалами, изменением уровня и активностей отщепленных изоформ Nox и степени комплексообразования между Nox и Hb. Введенные крысам L-аргинин, α -токоферол и селенат натрия оказывают мембраностабилизирующий эффект, регулированием приведенных показателей различной степени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1.Фесчан С.М., Симонян Р.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Роль гемоглобина в процессе появления экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин. *Вопр.Теорет.Клин.Мед.*, 2012,15(4): 12-16.

2.Фесчан С.М., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Окисление адреналина NADPH оксидазами и изменение их активностей и форм оптических спектров поглощения *in vitro*. //*Вопр Теорет., Клин.Мед.*, 2012, 15(4): 32-35.

3.Фесчан С.М., Симонян Р.М., Саргсян А.С., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. α -Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс. *Вопр.Теорет.Клин.Мед.*, 2013, 16(1): 36-39.

4.Фесчан С.М. Симонян Р.М., Варданян А.Г., Бабаян М.А, Симонян М.А., Енгибарян А.А. Рилизинг NADPH оксидазы из клеточных компонентов крыс и стимулирование активности этого фермента аминокхромами *ex vivo*. *Мед. наука Армении НАН РА т. L III, N 1*, 2013, 3-19

5.Фесчан С.М., Симонян Р.М., Батикян Г.Г., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Подавление селенатом натрия экспрессию изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных формирований кардиомицитов крыс *ex vivo*. *Вопр.Теорт.Клин.Мед*, 2013, 16(5): 3-6.

6.Фесчан С.М., Стимуляция ферригемоглобином рилизинга изоформ NADPH–оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и

подавление этого процесса α -токоферолом и L-аргинином *ex vivo*. Медицина, наука и образование, 2013, 96-102.

7. Фесчян С.М., Симонян Р.М., С.С.Александрян, А.А.Енгибарян, М.А.Симонян. Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс. *Вопр.Теорет.Клин.Мед.*, 2013, 16(8): 75-78.

8. Фесчян С.М., Симонян Р.М., Маргарян А.С., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Характерные изменения свойств изоформ NADPH оксидазы из клеточных компонентов тканей крыс под влиянием подкожно введенного адреналина. *Медицина, наука и образование*, 2015, 37-42.

9. Фесчян С.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Регулирование уровня активности изоформ NADPH оксидазы мембран клеточных компонентов крыс при острой адреналиновой интоксикации под влиянием L-аргинина, α -токоферола и селената натрия. *Вопр.Теорет.Клин.Мед.*, 2014, 17 (7); 3-8.

10. Фесчян С.М., Симонян М.А., Енгибарян А.А. Механизмы оксидативного повреждения кардиомиоцитов и факторы защиты при адреналин-индуцированном некрозе миокарда в эксперименте. Доклад .Годовая отчетная сессия научных работ ЕРМУ им. Мхитаря Гераци, 2013г.

Սոնա Մկրտիչի Ֆեսչյան

Ադրենալինով հարուցված հյուսվածքների բջիջների օքսիդատիվ վնասման մեխանիզմները և պաշտպանիչ գործոնները էքսպերիմենտում

Ամփոփում

Բանալի բառեր -ադրենալին, հակաօքսիդանտ, ազատ ռադիկալ, ՆԱԴՖՈ օքսիդազա

Աերոբ նյութափոխանակայի գործընթացների, մասնավորապես իմունային համակարգի, գեների էքսպրեսիայի, միտոքոնդրիալ շնչառության, թթվածնային հոմեոստազի, բջիջների պրոլիֆերացման և ապոպտոզի ընթացքում ֆիզիոլոգիապես անհրաժեշտ քանակներով սուպերօքսիդռադիկալի (O_2^-), կրա ածանցիկների (H_2O_2 , HO^\bullet , HO_2^\bullet , NO^\bullet , $OONO^\bullet$ -նայլն) մասնակցությամբ օքսիդա-վերականգնման գործընթացների կարգավորման ժամանակ շատ կարևորվում է ներբջջային և արտաբջջային ՆԱԴՖՈ օքսիդազի (Nox) իզոմերների դերը: Հայտնի են Nox-երի 5 իզոմերներ և դրանց սպիտակուցային կարգավորիչներ (Rac1, Rac2), որոնք գործում են համակցված մեխանիզմով: Կլինիկական հետազոտությունների համար առավել կարևորվում է էրիթրոցիտների թաղանթներից անջատված Nox-ը [George A. et al., 2013]:

Ատենալիտոսության մեջ ներկայացվում են ուսումնասիրություններ, որոնք առնչվում են ներբջջային և արտաբջջային ՆԱԴՖՈ օքսիդազների (eNox) հատկությունների փոփոխման հետ ադրենալինով և դրա օքսիդացման վերջանյութերով հարուցված օքսիդատիվ վնասման ժամանակ: Կարևորվում է այն փաստը, որ այս գործընթացում խթանվում է ադրենալինով ինդուցված ջրածնի պերօքսիդի, հետևաբար HO_2^\bullet ռադիկալների քանակի աճ (որպես O_2^- ների ֆերմենտային մեխանիզմով դիսմուտացման հետևանքով գոյացած ջրածնի պերօքսիդի անցողիկ մետաղների իոնների հետքերի ազդեցությամբ ձեռքման վերջանյութ): Այս կերպ ադրենալինը ցուցաբերում է

կարդիոտոքսիկ ազդեցություն՝ վնասելով ոչ միայն կարդիոմիոցիտների, այլև այլ հյուսվածքների բջջային և ներբջջային կազմավորումների թաղանթները:

Առաջին անգամ մոլեկուլային մակարդակով որոշվել են ադրենալինի օքսիդացման վերջանյութերով (ադրենոքրոմ, ամփնոքրոմներ), առնետի հյուսվածքների բջջաթաղանթների և ներբջջային կազմավորումների թաղանթների, ինչպես նաև արյան շիճուկի և ասցիտային հեղուկների էկզոսոմների Nox-ի իզոմերին հարուցված օքսիդացման վնասվածքային մոլեկուլային-կենսաքիմիական մեխանիզմները և պաշտպանիչ գործոնները (L-արգինին, α -տոկոֆերոլ, նատրիումիսելենատ):

Որոշվել է ադրենալինի կոնցենտրացիայից կախված Nox-ի իզոմերի օպտիկական-սպեկտրային հատկանիշների, ՆԱԴՖH-կախյալ O_2^- -ների գոյացման և ֆերիհեմոգլոբինի (ֆերիHb) վերականգնման ակտիվությունների, Nox-ի իզոմերի՝ բջջաթաղանթներից արտազատման (ռիլիզինգ) և ֆերիHb-ի հետ Nox-ի կոմպլեքսագոյացման աստիճանի բնորոշ փոփոխությունները *in vitro*, *ex vivo* և *in vivo*, նշված հակաօքսիդանտների բացակայության և ներկայության պայմաններում:

Ցույց է տրվել, որ հյուսվածքների բջջաթաղանթների և ներբջջային կազմավորումների թաղանթներից անջատված և մաքրված Nox-ի իզոմերը, շնորհիվ գեներացված O_2^- -ների, օքսիդացնում են ադրենալինը ադրենոքրոմի, ապա ամփնոքրոմների: Վերջիններս որոշակի քանակներով ատոսացվում են Nox-ի մոլեկուլի հետ՝ հիմնականում անդառնալիորեն փոփոխելով դրանց օպտիկական-սպեկտրալ հատկությունները և ակտիվությունները *in vitro*: Ընդ որում ցածր կոնցենտրացիայի ամփնոքրոմները ավելացնում, իսկ բարձրերը ընկճում են Nox-երի ակտիվությունները: Ճնշելով թաղանթների լիպիդային պերօքսիդացումը՝ հակաօքսիդանտներ L-արգինինը, α -տոկոֆերոլը և նատրիումի սելենատը որոշակիորեն կանխում են Nox-ի իզոմերի ռիլիզինգը սրտի, փայծաղի, երիկամի, լյարդի, թոքի բջջաթաղանթային կազմավորումներից և էկզոսոմներից՝ ցուցաբերելով թաղանթակայունացնող ազդեցություն *ex vivo* և *in vivo*՝ առնետներին ադրենալինով հարուցված թունայնացման ժամանակ: Առնետներին ներմաշկային ներարկված ադրենալինով հարուցված սուր թունայնացման մոլեկուլային-կենսաքիմիական մեխանիզմները առնչվում են բջջաթաղանթների, մասնավորապես կարդիոմիոցիտների թաղանթների լիպիդային պերօքսիդացման (LՊ) խթանման և Nox-ի իզոմերի արտազատման բարձրացման հետ: Բջջաթաղանթների և ներբջջային կազմավորումների թաղանթների լիպիդային պերօքսիդացումը նախորդում է հեմոգլոբինով ինդուցված Nox-ի իզոմերի արտազատմանը այս թաղանթներից: Այս ֆոնի վրա նվազում է արտազատված Nox-ի իզոմերի մակարդակը, որպես հետևանք՝ ամփնոքրոմով ինդուցված O_2^- երի և HO^{\cdot} երի քանակի ավելացման (այս ռեակտիվ միջանկյալ միացությունները անդարձելիորեն դեգրադացնում են Nox-ի իզոմերը): Բացառություն է կազմում էկզոսոմային eNox-ը, որը ցուցաբերում է բարձր դիմադրողականություն ընդդեմ HO^{\cdot} -ռադիկալների:

LՊ-ի ոչ ադեկվատ ընկճման հետևանքով, շնորհիվ HO^{\cdot} երի քանակի նվազման, էկզոգեն ներարկված L-արգինինը, α -տոկոֆերոլը և նատրիումի սելենատը ցուցաբերում են ո համանման պաշտպանիչ դեր ադրենալինով հարուցվա կարդիոթունայնացման ժամանակ: Այս պայմաններում դիտվում են նշված չափանիշների փոփոխություններ ստուգիչի համեմատ: Սա ներկայացվում է որպես հյուսվածքների բջջաթաղանթների, ներառյալ սրտի բջջաթաղանթների, օքսիդատիվ վնասման նոր մեխանիզմ:

Այսպիսով, նպատակահարմար է համարվում α -տոկոֆերոլի, նատրիումի սելենատի և հատկապես L- արգինինի՝ կլինիկայում օգտագործումը՝ կանխելու համար ադրենալինով հարուցված կարդիոմիոցիտների, միաժամանակ այլ հյուսվածքների բջջաթաղանթների ու ներբջջային կազմավորումների թաղանթների օքսիդատիվ վնասումը:

Sona Mkrtych Feschyan

The Mechanisms of Adrenaline Induced Oxidative Damage of the Tissues Cells and Protective Factors in Experiment

Summary

Key words - adrenaline, free radical, NADPH oxidase (Nox) , antioxidants

In the aerobic metabolic processes, particularly at the regulation of oxido-reducing acts at the gene expression, mitochondrial respiratory burst, oxygen homeostasis, at the proliferation and apoptosis of the cells, by physiological necessary amount of the superoxide radical (O_2^-) and its derivatives (H_2O_2 , HO^\cdot , HO_2^\cdot , NO^\cdot , $OONO^\cdot$ etc.), the regulating role of the isoforms of intracellular and extracellular NADPH oxidase (Nox) are of special importance.

The 5 isoforms of Nox and its protein regulators (Rac1, Rac2) acting by combined mechanism are well known. Recently, it was revealed that these enzymes could act by autonomous mechanisms.

For the clinical investigations the Nox from erythrocytes membranes are of special significance. However, it was confirmed by others 19 years later [George A. et al., 2013]. The investigations are associated with the changes of the properties of intracellular and extracellular NADPH oxidases at the adrenaline and its oxidation products induced oxidative damage were presented in the thesis.

The fact, that the increase of hydrogen peroxide amount induced by adrenaline and HO^\cdot -radicals is stimulated, is of high importance.

The hydrogen peroxide is a product of the enzymatically dismutation of O_2^- and as a result of decay to the hydrogen peroxide in the presence of the traces of transients metals ions, the HO^\cdot -radicals were formed.

The adrenaline shows cardiotoxic effect by means of damaging not only cardiomyocytes, but also the cells membranes and the membranes of intracellular components of the other tissues.

For the first time the molecular-biochemical mechanisms of oxidative damage and protective factors (L-arginine, α -tocoferol and sodium selenate) for isoforms of Nox from exosomes of blood serum and fluids of ascetic carcinomas, from cells membranes and membranes of intracellular components of rats' tissues induced by the products of adrenaline oxidation (adrenochrome and aminochromes) were determined. By the adrenaline concentration depending manner the characteristic changes of the optical-spectral properties, NADPH depending O_2^- producing and ferriHb-reducing activities of the isoforms of Nox, the degree of the releasing of the isoforms from cells membranes, and the level of the formation of complex between the ferriHb and Nox in the absence and presence of L-arginine, α -tocoferol and sodium selenate were determined *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. It is shown that the isoforms of Nox isolated and purified from cells membranes and membranes of intracellular components oxidize the adrenaline to adrenochrome and later to aminochromes. The latter is connected with the Nox molecule and change its optical-spectral properties and activities *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. Besides, the low concentrations of aminochrome increase the activities of Nox, conversely the high concentrations decrease these activities. On the other hand thanks to the aminochromes stimulate the releasing of Nox *ex vivo* (cells membranes and the membranes of intracellular components incubated with the adrenaline). As

a result of the formation of the complex compound between Nox and hemoglobin, the releasing of the eNox from exosomes, localised in the fluids of ovarian ascidic carcinomas was observed. L-arginine, α -tocoferol and sodium selenate prevent the releasing of isoforms of Nox from membranes of cell components of heart, kidney, liver, lung and exosomes by suppression of lipid peroxidation, correspondingly the releasing of Nox and stabilization of cell membranes *ex vivo* and *in vitro* were observed.

The molecular-biochemical mechanisms of acute intoxication induced by intracutaneous injection of adrenaline of rats referred to the stimulating effect of lipid peroxidation of cardiomyocyte membranes and the increase of releasing of Nox isoforms. Lipid peroxidation is induced by the aminochromes and this fact is confirmed by the other researchers too. The lipid peroxidation of cells membranes and membranes of intracellular components precedes the releasing of Nox isoforms from these membranes induced by hemoglobine. On this background the level of released isoforms of Nox is decreased as a result of O_2^- and HO^{\bullet} quantity-increasing effect induced by aminochrome. As a result of inadecuate decrease of the amount of HO^{\bullet} and suppression of the lipid peroxidation, the exogenously injected L-arginine, α -tokoferol and sodium selenate show corresponding protective effect at adrenaline-induced cardiotoxicity. In these conditions, the changes of indices are observes in comparison with the control indices. Exceptionally, the eNox from exosomes shows high counteraction against HO^{\bullet} -radicals. This phenomenon is defined as a new mechanism of the oxidative damage of the tissues, including membranes of cardiomyocytes cells membranes.

Thus, the use of α -tocoferol and sodium selenate, particularly L-arginine in clinical research to prevent adrenaline-induced oxidative damage of cardiomyocytes, other tissues cells membrane and the membranes of subcellular components.