

*На правах рукописи*

ЧИСТЯКОВ ВЛАДИМИР АНАТОЛЬЕВИЧ

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ  
ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

03.01.04- биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Ростов-на-Дону  
2011

Работа выполнена в НИИ биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор  
Внуков Валерий Валентинович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Арутюнян Александр Вартанович**

доктор биологических наук  
**Федорова Татьяна Николаевна**

доктор биологических наук,  
Заслуженный деятель науки РФ, профессор  
**Косицын Николай Степанович**

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии им.  
И.М.Сеченова РАН (ИЭФБ РАН)

Защита состоится «3» марта 2011 г. в «\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д212.208.07 в ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет» (г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, актовЫй зал)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет» по адресу: г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 148

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Асланян Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Окислительный стресс лежит в основе действия самых разных экстремальных и патогенных факторов (Lee et al., 1983; Toyokuni, 1999; Fridovich, 2000; Wells et al., 2005; Sedelnikova et al., 2010). В их число входят гипоксия/ишемия, воспалительные и аутоиммунные процессы, токсическое действие многих ксенобиотиков, в частности, тяжелых металлов, диоксинов (Koizumi, 2000) и микотоксинов (Atroschi et al., 2002), гипербарическая оксигенация (ГБО). Существуют серьезные доказательства того, что накопление модифицированных активными формами кислорода (АФК) биомолекул является причиной развития тяжелых, а порой и необратимых нарушений процессов и структур, поддерживающих гомеостаз организма. Прооксиданты вызывают самый широкий спектр негативных эффектов – от острой токсичности до гибели клеток как по пути апоптоза, так и некроза, индукции летальных мутаций и гормональных нарушений. Процессы свободнорадикального окисления являются одной из движущих сил развития старения, а, следовательно, лежат в основе большинства возрастных патологий (Harman, 1956; Скулачев 1999, 2005, 2007, 2009).

К началу 80-х годов прошлого века в результате серии исследований, выполненных Д. Джилбертом, Р. Гершман, И. Фридовичем, Н.М. Эммануэлем и др. были в основном сформированы современные представления о системе механизмов, основной, специфической функцией которых является защита клетки от окислительного стресса за счет инактивации АФК.

В то же время, многие экспериментальные факты, в частности наличие высокой антиоксидантной активности катаболитов нуклеиновых кислот и белков, способность митохондрий снижать внутриклеточное парциальное давление кислорода и т.д., указывают на то, что помимо специфических существуют эффективные механизмы защиты от окислительного стресса, основанные на использовании веществ и процессов, которые в норме выполняют другие функции, связанные с синтезом и распадом биомолекул, выработкой энергии и др. Эти механизмы можно назвать «неспецифическими механизмами защиты клетки от окислительного стресса».

Их изучение поможет глубже понять принципы взаимодействия живых систем с агрессивной для них кислородной средой. Неспецифические защитные механизмы – более древние и примитивные, формировались на ранних этапах развития аэробной жизни. Поэтому их исследование дает возможность лучше представить этапы развития современных метаболических путей и клеточных структур. Так, выдвинутая В.П. Скулачевым в 1994 году гипотеза о существовании дополнительной функции митохондрий, связанной с защитой от кислорода, по-прежнему остается единственной рациональной основой объяснения постепенности их симбиогенного происхождения.

Примитивность, а, следовательно, простота неспецифических защитных механизмов определяет значимость их исследования для поиска новых путей повышения адаптационных возможностей организма при помощи антиоксидантов, поскольку чем проще система, тем больше вероятность ее эффективной работы в новых условиях.

Таким образом, актуальность разработки концепции неспецифических механизмов защиты клетки от окислительного стресса определяется, с одной стороны, важностью данной проблематики, а с другой - недостаточно системным характером представлений, существующих на сегодняшний день в данной области биохимии.

**Цель и задачи работы.** Целью настоящего исследования было установление механизмов неспецифической защиты от индукторов окислительного стресса и разработка на их основе путей коррекции патобиохимических последствий взаимодействия активных форм кислорода с биомолекулами.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Исследовать способность ионов марганца защищать ДНК от АФК *in vitro* и *in vivo*.
2. Исследовать антиоксидантную активность аллантаина и мочевой кислоты, в том числе способность этих веществ защищать генетический аппарат клетки от АФК.
3. Исследовать супероксидустрояющую активность представителей основных групп аминокислот, входящих в состав белков.
4. Исследовать устойчивость ковалентно замкнутой кольцевой ДНК, линейной ДНК, а также РНК к деструктивному действию АФК.
5. Изучить роль дыхательной системы дрожжей-сахаромицетов в защите от токсического действия кислорода под давлением.
6. Сравнить антиоксидантную активность пула низкомолекулярных соединений из тканей видов рыб, отличающихся по «эволюционному возрасту».
7. Исследовать способность катионного производного пластохинона - 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфония (SkQ1) снижать уровень повреждения ДНК активными формами кислорода.

Первые пять экспериментальных задач посвящены изучению неспецифических механизмов защиты от окислительного стресса, действующих на базовых уровнях организации живых систем: уровне неорганических соединений, уровне низкомолекулярных органических соединений, уровне биополимеров (нуклеиновых кислот), субклеточном уровне.

Две последние задачи имеют прикладной характер. Полученные ранее результаты позволили сформулировать предположение о том, что «процветающие реликтовые формы», в частности, виды семейства

*Acipenseridae*, могут отличаться гипертрофированным развитием систем неспецифической защиты от окислительного стресса, а, следовательно, служить источником высокоэффективных смесей антиоксидантов. Проверка этого предположения стала одной из задач работы.

Развитие современной биохимии позволяет перейти к использованию сложных антиоксидантных конструкций, способных адресно накапливаться в митохондриях, где генерируется большая часть клеточных АФК.

Под руководством В.П. Скулачева был создан и исследован ряд липофильных катионов, в которых пластохинон объединен с трифенилфосфонием. Использование растительного метаболита пластохинона в антиоксидантных конструкциях, предназначенных для животных, можно рассматривать как эксплуатацию его неспецифической антиоксидантной активности.

Задачей завершающего этапа работы было исследование способности SkQ1 модифицировать процессы повреждения ДНК, опосредованные действием активных форм кислорода *in vivo*.

**Научная новизна.** В результате проведенных исследований были впервые получены новые данные, имеющие существенное значение для понимания роли ряда неспецифических механизмов защиты клетки от окислительного стресса:

- обнаружена способность марганца защищать ДНК от продуктов реакции Фентона;
- подтверждена и количественно оценена способность аллантаина защищать ДНК клетки от повреждения АФК *in vitro*;
- обнаружена высокая антиоксидантная активность лизина, превышающая таковую для серусодержащих аминокислот;
- показано существование различных механизмов разрушения кольцевых и линейных ДНК в условиях генерации АФК;
- выявлена способность ГБО вызывать SOS-индукцию у *E. coli*, а также способность аскорбиновой кислоты усиливать токсичность ряда тяжелых металлов;
- описан феномен гиперчувствительности дыхательных мутантов диплоидных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к ГБО;
- проведен сравнительный анализ способности этанольных экстрактов тканей различных видов рыб защищать ДНК от повреждения АФК *in vivo*, выявлена более высокая протекторная активность экстрактов тканей осетровых рыб по сравнению с костистыми рыбами;
- исследована способность митохондриально направленного производного пластохинона SkQ1 снижать фоновый уровень повреждения ДНК активными формами кислорода *in vivo*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании полученных результатов была сформулирована и обоснована концепция, учитывающая важную роль неспецифических механизмов защиты от

деструктивного действия активных форм кислорода, таких как: синтез метаболитов с высокой антиоксидантной активностью; формирование молекул ДНК с защищенной от АФК пространственной структурой; активизация дыхания в обеспечении существования клеток в кислородной среде.

Разработанные при выполнении работы методы определения активности супероксиддисмутазы и генотоксичности химических соединений применяются в настоящее время для скрининга биологической активности природных и синтетических соединений, мониторинга качества водной среды Азово-Черноморского бассейна.

Результаты по стабильности ДНК в кислородной среде были применены для разработки методов сохранения ДНК-содержащих образцов в Национальной коллекции генетических материалов при ВНИРО, которые используются в качестве эталонов при ДНК-идентификации происхождения экспортных партий черной икры.

Результаты доклинических испытаний препарата SkQ1 использованы «НИИ Митоинженерии МГУ» при разработке ветеринарного препарата «Визомитин» и препарата для лечения заболеваний глаз, который в настоящее время проходит клинические испытания.

Материалы работы используются при чтении лекций на кафедрах биохимии и генетики Южного федерального университета в спецкурсах: «Основы патобиохимии», «Свободные радикалы в биологических системах», «Основы мембранологии», «Современные проблемы генетики», «Нехромосомная наследственность», «Мутагены окружающей среды»

Проведенные исследования послужили основой четырех изобретений, на которые получены авторские свидетельства.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Способность ионов марганца защищать ДНК от АФК, генерируемых в реакции Фентона, лежит в основе неспецифического антиоксидантного механизма, реализуемого на уровне неорганических соединений.
2. Низкомолекулярные органические азотсодержащие соединения – метаболит мочевой кислоты аллантаин и аминокислоты - аланин, валин, изолейцин, метионин, цистеин, лизин, гистидин, треонин, аспарагин и глутаминовая кислота обладают антиоксидантной активностью.
3. Замыкание ДНК в кольцо может быть эффективным механизмом защиты ДНК от АФК, не связанным с их перехватом, который реализуется на уровне макромолекул.
4. Снижение парциального давления кислорода за счет работы дыхательной системы дрожжей лежит в основе защиты этих микроорганизмов от гипербарической оксигенации. Данный механизм реализуется на уровне органелл.
5. Высокая антиоксидантная активность экстрактов тканей осетровых рыб по сравнению с костистыми рыбами является примером высокого

уровня неспецифических механизмов защиты от АФК, характерного для процветающих реликтовых форм.

6. Препарат SkQ1 (10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфоний), способен эффективно понижать уровень повреждения ДНК активными формами кислорода. Использование компонента цепи переноса электронов в хлоропластах – пластохинона – в антиоксидантных конструкциях, предназначенных для митохондрий животных, можно рассматривать как эксплуатацию его неспецифической антиоксидантной активности.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на следующих конференциях: 2-й съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000); Всероссийская научная конференция «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России» (Краснодар, 2001); Всероссийская научно-практическая конференция «Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине» (Ростов-на-Дону, 2007); Конференция «Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие регионов Юга России» (Сочи, 2007); «Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability» (St.Petersburg, Russia 2008); Международный Междисциплинарный Симпозиум «От экспериментальной медицины к превентивной и интегративной медицине» (Судак, 2008); Международная конференция «Биоэнергетика в прошлом, настоящем и будущем: путь к “Homo sapiens liberatus”» (Москва, 2010), VI Съезд Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010).

**Публикация результатов исследований.** По материалам диссертации опубликовано 33 работы (6,7 п.л., личный вклад 41,2%), в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ - 19 статей, получены 3 патента и 1 авторское свидетельство.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 282 страницах и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований с обсуждением их результатов в каждой главе, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 19 рисунками. Список литературы включает 74 источника отечественных и 373 иностранных авторов.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (грант «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 гг.)» № 2.1.1/5628) и ООО «НИИ митоинженерии МГУ» (проект «Практическое использование ионов Скулачева»)

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Объектом исследования в опытах по влиянию солей марганца на разрушение ДНК *in vitro* служили молекулы длиной 414 п.н., полученные в результате рутинной процедуры ПЦР-амплификации образцов ДНК *Acipenser gueldenstaedti*. ДНК обрабатывали перекисью водорода в присутствии солей железа, марганца и урата. Нативность ДНК определяли при помощи ПЦР.

Для оценки протекторной активности марганца *in vivo* была исследована способность этого вещества супрессировать генотоксичность перекиси водорода в SOS-lux тесте, основанном на использовании штамма *E. coli* PT-1(C600(pPLS1)), несущего плазмиду, содержащую lux-оперон *Photobacterium leognathi* под контролем сильного SOS-промотора, представляющего часть *sda* гена плазмиды ColD (Ptitsyn et al., 1997). Повреждение ДНК тестерного штамма ведет к индукции свечения. Для коррекции артефактов, связанных с подавлением активности люциферазы, использовали дополнительный штамм PT-5 (C600(pBA5)), генотип которого аналогичен SOS-lux штамму, но lux-оперон находится под контролем конститутивного промотора, обеспечивающего постоянный уровень экспрессии люциферазы (Сазыкина и др., 2000; 2002). Дополнительный штамм позволяет оценивать, как изменяется активность люциферазы за счет механизмов, не связанных с индукцией фермента, что делает возможным расчет соответствующего коэффициента коррекции.

Величина, характеризующая генотоксичность, — фактор индукции  $I'$ , показывает, во сколько раз увеличилась интенсивность свечения тестерного штамма после инкубации с мутагеном с поправкой на подавление свечения.

Для оценки антиоксидантной активности аллантаина и урата был использован интегральный показатель — способность этого вещества подавлять вызванную перекисью водорода SOS-индукцию у *E. coli*.

Показатель антиоксидантной/антимутагенной активности (А) рассчитывали как процент уменьшения генотоксической активности перекиси водорода в присутствии изучаемой пробы.

В качестве характеристики взаимодействия изученных соединений с  $O_2^{\cdot-}$  использовали супероксидустраняющую активность (СУА), определяемую по разработанной нами методике (Чистяков и др., 1992). Данные по СУА аминокислот представляли в виде единиц активности супероксиддисмутазы, рассчитанных согласно Фридовичу (1973).

Удельную супероксидустраняющую активность рассчитывали по формуле:

$$C_{уд} = СУА/С,$$

где  $C_{уд}$  — удельная супероксидустраняющая активность;  
С — концентрация аминокислот в мМ.



Для экспериментального исследования роли топологической организации нуклеиновых кислот при защите от повреждающих агентов использовали систему генерации АФК, позволяющую определить степень разрушения линейных и кольцевых суперспиральных молекул ДНК и суммарной РНК.

В качестве источника линейной хромосомной ДНК и суммарной РНК использовали штамм *E.coli* АВ 1157. ДНК и РНК выделяли с использованием фенольной депротеинизации, затем разделяли хроматографией на сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция). Ковалентно замкнутую кольцевую ДНК выделяли из штамма НВ-101 — носителя плазмиды рВR-322 по методу Кизера (1984).

Для получения гидроксильных радикалов в систему генерации супероксидного аниона, образующегося при аутоокислении гидроксиламина в нитрит, вводили ионы  $\text{Cu}^{2+}$ . В качестве перехватчика гидроксильных радикалов использовали раствор маннита. Деградацию нуклеиновых кислот *in vitro* учитывали, измеряя флуоресценцию комплексов нуклеиновых кислот с бромидом этидия.

Для определения способности активных форм кислорода вызывать однонитевые разрывы в ковалентно замкнутых кольцевых ДНК использовали их свойство быстрой ренатурации после щелочной денатурации, применяемое во многих методах выделения ковалентно замкнутых кольцевых ДНК (Кантор, Шиммель, 1984). Определение сводилось к измерению флуоресценции комплекса ДНК-бромид этидия после инкубации при рН=12,3 и последующей нейтрализации до рН = 8,0.

Степень деградации нуклеиновых кислот рассчитывали по формуле:

$$D = \left( 1 - \frac{k \times (F_o - F_f)}{F_k - F_f} \right) \times 100\%$$

где:

$F_o$  - флуоресценция опытной пробы нуклеиновой кислоты;  
 $F_k$  - флуоресценция контрольной пробы нуклеиновой кислоты;  
 $F_f$  - флуоресценция 0,5 мкг/мл бромистого этидия в соответствующем буфере.

С целью учета поглощения сульфата меди в области 500-700 нм при измерении флуоресценции для каждого буфера в модельных опытах определяли коэффициент гашения флуоресценции ионами меди (k):

$$k = \frac{F_{Et}}{F_{\text{Cu}^{2+}}}$$

$F_{Et}$  - флуоресценция раствора бромистого этидия без  $\text{CuSO}_4$ ;

$F_{\text{Cu}^{2+}}$  - флуоресценция раствора бромистого этидия в присутствии определенной концентрации  $\text{CuSO}_4$ .

Для определения токсичности металлов в присутствии аскорбата использовали стандартный протокол биолюминесцентного теста на токсичность (Суслов, Данилов, 1996) с использованием рекомбинантного штамма *E.coli* В 5356. Результаты всех экспериментов с биосенсорами

рассчитывали по данным минимум трех измерений. Эксперименты проводили в трех независимых повторностях.

В экспериментах по выживаемости дрожжей после гипербарической оксигенации (ГБО) обрабатывали чашки Петри с полной средой, засеянные исследуемыми культурами. В биохимических экспериментах суспензии дрожжей в полной среде обрабатывали ГБО в пенициллиновых флаконах. Немедленно после обработки клетки отмывали от среды 0,1 М Na фосфатным буфером с pH 7,4.

Во всех биохимических экспериментах дрожжи гомогенизировали по модифицированному методу (Bhaduri, Demchick, 1983). Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), определяли по методу Ushiyama, Mishara (1978). Определение белка проводили по методу Лоури (Кочетов, 1981). Каталазную активность определяли по методу Баха и Зубковой (Березов, 1976). Определение суммарной пероксидазной активности проводили по методу Ornstein в модификации Лукаша (1995). Определение СОД активности проводили по разработанному нами методу (Чистяков и др., 1991). Биохимические параметры дрожжей рассчитывали по данным 6-7 повторностей.

Материалом для исследования антимутагенной/антиоксидантной активности тканей рыб служили образцы гонад, печени и мышц 12 особей русского осетра *Acipenser gueldenstaedti*, хряща хорды трех особей севрюги *Acipenser stellatus*, гонад и печени 35 особей пиленгаса *Mugil soiyu*, 15 особей чехони *Pelecus cultratus*, и 5 особей тарани *Rutilus rutilus heckeli*. Рыбы были выловлены в 1999-2001 гг. в Азовском море. Органы для исследования замораживали до  $-20^{\circ}$  С и доставляли в лабораторию, где измельчали и экстрагировали пятью объемами 96 % этанола. Принцип оценки антимутагенного потенциала, как и в случае аллантаина, был основан на определении способности вещества или экстракта гидробионта подавлять SOS-индукцию, вызванную перекисью водорода у *E. coli*.

В экспериментах с ионами Скулачева самцам крыс Wistar (аутбредный сток), в возрасте 45 дней в течение 14 дней вводили SkQ1 по 25 и 250 нмоль/кг в день. Часть крыс после окончания введения препарата подвергли обработке ГБО в режиме 0,5 МПа в течение 60 минут.

Частоту аберраций хромосом определяли в роговице глаза при помощи анафазного теста (Дарлингтон, Ла Кур, 1980). Учитывали хромосомные фрагменты, хроматидные фрагменты, хромосомные и хроматидные мосты. Митотический индекс рассчитывали как процентное отношение числа делящихся клеток к общему числу проанализированных клеток (не менее 3000 для одного глаза). Всего для цитогенетических исследований было сформировано 6 групп по 10 животных.

Для биохимических экспериментов использовали животных с характеристиками, аналогичными вышеописанным, SkQ1 вводили по вышеприведенной схеме. Исследование внеклеточного 8-ОН-2-деоксигуанозина (8-ОНdG) проводили в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы - DNA Damage

ELISA Kit, (Biohem Acquires Assay Designs (США)), на автоматическом анализаторе Alisei (Италия). Число животных в контроле - 18, в опытных группах по 9.

Статистическую обработку проводили по стандартным биометрическим формулам. Для оценки статистической значимости различий использовали t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Уилкоксона (Манна-Уитни) (Лакин, 1990; Владимирский, 1983).

## Результаты и их обсуждение

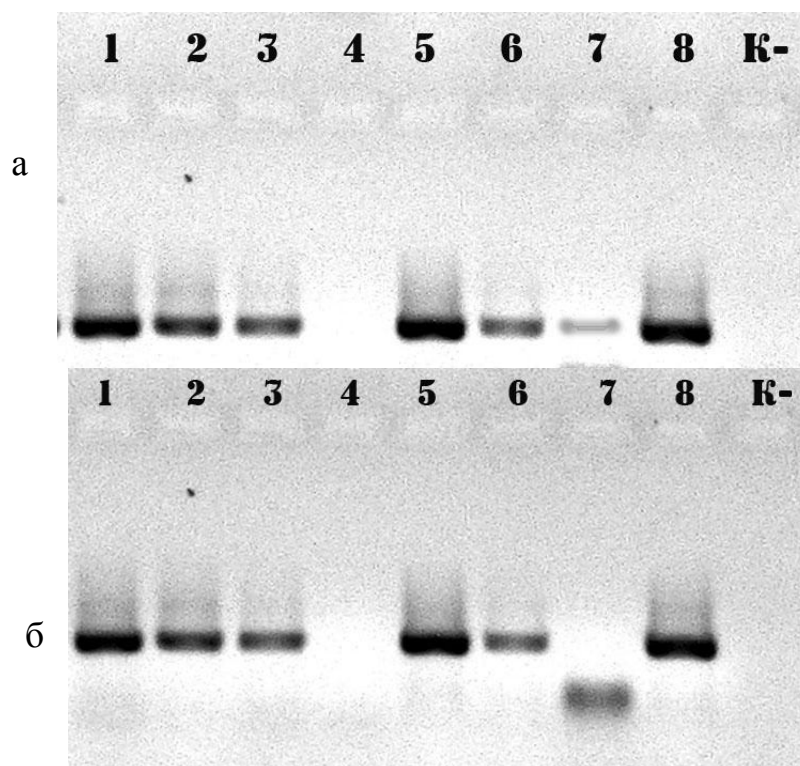
### Уровень неорганических соединений: оценка протекторных свойств марганца

Способность некоторых двухвалентных катионов усиливать деструктивное действие АФК — общеизвестный факт. Менее известно то, что еще в 1982 году Арчибальдом и Фридовичем были опубликованы данные о супероксидустраниющей активности ионов марганца (Archibald, Fridovich, 1982). В экспериментах *in vitro* было обнаружено, что двухвалентный марганец, взаимодействуя с супероксид-анионом и двумя протонами, окисляется до трехвалентного состояния с образованием перекиси водорода (Archibald, Fridovich, 1982). Позже были найдены косвенные доказательства эффективной работы данного цикла у некоторых микроорганизмов. По мнению Дэйли и соавторов (Daly et al., 2007), именно высокое содержание марганца обеспечивает резистентность бактерии *Deinococcus radiodurans* к дозам радиации, измеряемым десятками кГр. Согласно предположению Дэйли, участие марганца в защите *D. radiodurans* от радиации указывает как на первичность супероксид-аниона, а не гидроксильного радикала, так и на первичность повреждения белков, а не нуклеиновых кислот, в развитии радиационного повреждения микроорганизмов. Эта гипотеза выглядит несколько избыточной. Логичнее предположить, что ионы марганца способны обеспечивать защиту ДНК, которая, по классическим представлениям, является главной клеточной мишенью для ионизирующих излучений от гидроксильного радикала. Проверка этого предположения была задачей экспериментов, описанных в данной главе.

Результаты эксперимента представлены на рис. 1а. Как видно на рисунке, исследованные концентрации перекиси водорода и железа по отдельности не вызывают повреждения ДНК в использованной нами системе (дорожки 2, 3). Объединение двух компонентов реактива Фентона делает амплификацию исследованных ДНК невозможной (дорожка 4). Введение в реакционную смесь ионов марганца в концентрации, в 10 раз превышающей концентрацию железа, полностью восстанавливает способность ДНК к амплификации (дорожка 5). Введение эквимольной и дециэквимольной концентраций ведет к частичному восстановлению нативности (дорожки 6, 7). На рис. 1б представлены результаты исследования в данной экспериментальной системе одного из наиболее эффективных органических протекторов ДНК — мочевиной кислоты. В частности, урат применяется для

защиты ДНК при помощи одного из наиболее распространенных средств для ее длительного хранения — ФТА карт (Burgoyne, 1998). Однако, как видно на рисунке, использование урата в концентрации, близкой к насыщенной (1 мМ), не позволяет достичь характерного для марганца протекторного эффекта. ПЦР проходит неспецифично с образованием размытой высокомолекулярной фракции.

Перекись водорода — необходимый компонент процессов, открытых Фентоном и детально изученных Габером и Вейссом. Побочным продуктом фентоновских процессов является гидроксильный радикал, способный эффективно разрушать ДНК (Водолажский и др., 1987).



**Рис. 1.** Электрофореграммы продуктов амплификации нативной и обработанной АФК ДНК

**а)** 1; 8 — нативная ДНК; 2 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ; 3 —  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 %; 4 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ и  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 %; 5 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 % и  $\text{MnSO}_4$  8,125 мМ; 6 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 % и  $\text{MnSO}_4$  0,8125 мМ; 7 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 % и  $\text{MnSO}_4$  0,08125 мМ; К — негативный контроль.

**б)** Обозначения дорожек 1 — 6 и 8 аналогичны рис. а, 7 —  $\text{FeSO}_4$  0,8125 мМ и  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,25 % и 1 мМ урата.

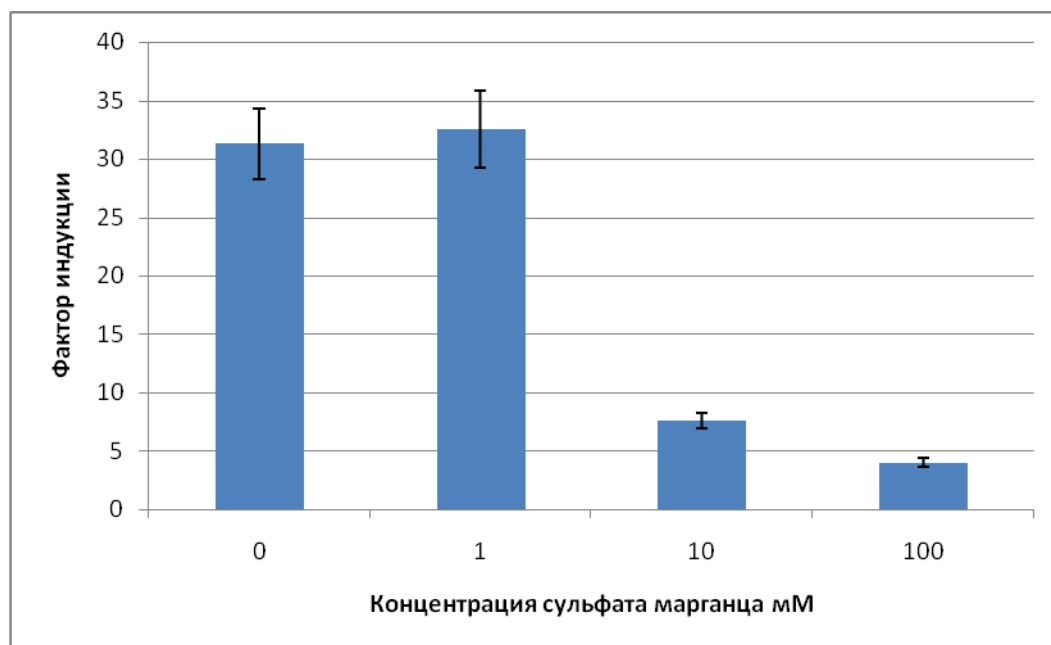
Данные об участии ионов марганца в фентоновских процессах достаточно противоречивы. С одной стороны, их комплексы с органическими молекулами катализируют разложение перекиси водорода, что должно, также как и перехват супероксид-аниона, тормозить развитие

реакций генерации АФК (Berlett et al., 1990). Но, с другой стороны, процесс разложения перекиси в присутствии марганца также может идти по свободно-радикальному механизму. В работе Mendez-Alvarez и др. (2001) отмечено 72 % снижение уровня генерации гидроксильного радикала и 17 % снижение количества перекиси водорода, образующихся при автоокислении 6-гидроксидофамина.

Наши эксперименты показали, что в условиях, близких к физиологическим, марганец катализирует реакции, ведущие к уменьшению свободно-радикального разрушения ДНК.

Эффективность действия марганца как антиоксиданта/антимутагена может быть проиллюстрирована тем, что  $MnSO_4$  в концентрациях 10 и 100 мМ подавляет генотоксичность перекиси водорода в концентрации  $10^{-5}$  М на 75,7 % и 87,2 %, соответственно. Концентрация  $MnSO_4$  1 мМ не дает протекторного эффекта (рис. 2).

Таким образом, способность ионов марганца защищать ДНК от разрушения в фентоновских процессах проявляется и в форме подавления генотоксичности перекиси водорода. По-видимому, накопление марганца бактериями позволяет им не только имитировать супероксиддисмутазную активность, но и формировать целый комплекс защитных механизмов, которые обеспечивают как удаление супероксид-аниона, так и защиту ДНК от агрессивных продуктов фентоновских процессов, в первую очередь, от гидроксильного радикала.



**Рис. 2.** Индукция SOS-ответа *E. coli* перекисью водорода в концентрации  $10^{-5}$  М в присутствии сульфата марганца

ДНК-протекторные свойства солей марганца были использованы нами для создания методики консервации образцов ДНК внутри пластиковых пленок (Чистяков и др., 2007; 2009). Эта методика позволяет при помощи стандартного офисного ламинатора формировать компактные пакеты

архивных образцов ДНК, защищенных, в отличие от FTA-карт, от избытка влажности, потравы насекомыми и т.д.

### **Уровень низкомолекулярных органических соединений: участие азотсодержащих низкомолекулярных соединений в защите от окислительного стресса**

Исследования последних десятилетий выявили целый ряд веществ, специфической функцией которых является защита клетки от АФК. Менее изучены антиоксидантные свойства веществ, основная функция которых, по существующим представлениям, не связана с защитой от кислорода. Весьма интересны в этом плане азотсодержащие соединения, наиболее изученным представителем которых является мочевая кислота.

Непосредственным катаболитом урата у большинства позвоночных, за исключением приматов, является аллантиин, и, таким образом, вопрос об антиоксидантной способности аллантиина представляет несомненный интерес. Квантово-химические расчеты, проведенные Корниенко с соавт. (2002), позволили предположить у некоторых аминокислот способность реагировать с супероксид-анионом.

Таким образом, задачей данного раздела работы было исследование антиоксидантной активности аллантиина, урата и аминокислот.

Аллантиин, урат. Как видно из результатов, представленных в табл. 1, аллантиин и аскорбат проявляют способность супрессировать вызванную перекисью водорода SOS-индукцию. При этом максимальная активность аллантиина регистрируется для концентрации  $10^{-4}$  М, а аскорбата -  $10^{-2}$  М. Кроме того, антимутагенная активность аллантиина сохраняется и для малых концентраций –  $10^{-10}$  и  $10^{-9}$  М, в которых аскорбат начинает усиливать SOS-индукцию, вызванную перекисью.

Данное явление связано, по-видимому, со взаимодействием аскорбата, перекиси и железа, присутствующих в питательной среде для бактерий. Рассматривая результаты эксперимента в целом, отметим, что оба исследованные соединения обладают способностью подавлять генотоксическое действие перекиси водорода.

Подавление аллантиином как мутагенеза, так и SOS-ответа, развивающегося под действием перекиси водорода, указывает на способность этого вещества непосредственно защищать ДНК от деструктивного действия гидроксильного радикала, что характерно и для мочевой кислоты. При этом максимальный антимутагенный эффект проявляется при введении аллантиина за 1,5 часа до обработки.

Отсутствие достоверного защитного эффекта при одновременном введении перекиси и аллантиина, по-видимому, объясняется разными скоростями проникновения этих веществ в клетку.

Таблица 1

Индукция SOS-ответа *E. coli* перекисью водорода ( $10^{-4}$  М) в присутствии аллантаина, аскорбата и урата

Концентрация М	Аллантоин		Аскорбат		Урат	
	А, %	Фактор индукции ( $I_c$ )	А, %	Фактор индукции ( $I_c$ )	А, %	Фактор индукции ( $I_c$ )
0	0	141 ± 12	0	158±13	0	100±1
$10^{-10}$	75*	37 ± 2	-140	221±19	18*	82±5
$10^{-9}$	75*	37 ± 2	-226	356±23	23*	77±1
$10^{-8}$	75*	37±3	40*	95±8	62*	38±3
$10^{-7}$	86*	22±2	54*	73±5	65*	35±4
$10^{-6}$	82*	24±1	50*	79±5	40*	60±5
$10^{-5}$	86*	22±2	65,5*	55±4	49*	52±12
$10^{-4}$	93*	9±1	49*	80±6	66*	34±10
$10^{-3}$	64*	51±5	73*	43±2	68*	32±7
$10^{-2}$	75*	35±4	95,5*	7±0,3	Концентрации выше насыщенной при 30°C	
$10^{-1}$	64*	50±4	-	0,5**		

\* - статистически значимый протекторный эффект, *t*-критерий,  $p < 0,05$

\*\* - сильное подавление свечения

Квантово-химические расчеты, проведенные И.В. Корниенко, также подтверждают эффективность аллантаина в качестве антиоксиданта в реакциях его радикальной атаки активными формами кислорода (Гуськов и др. 2002). Сопоставление антимуtagenной активности аскорбиновой кислоты и аллантаина показывает, что последний является более эффективным протектором ДНК клетки от АФК.

Сопоставление полученных данных с наблюдениями за содержанием этого вещества в плаценте здоровых и страдающих патологиями женщин позволило высказать обоснованное предположение о том, что определенный уровень аллантаина «обеспечивает жизнеспособность развивающегося эмбриона млекопитающих» (Гуськов и др., 2004). Тем не менее, при интерпретации данных по антиоксидантной активности аллантаина у человека необходимо учитывать то, что мочева кислота также обладает определенной антиоксидантной активностью. Более того, урат является основным катаболитом азотсодержащих соединений у высших приматов и предшественником аллантаина у животных, выделяющих азот в виде более простых соединений. Способность этого вещества защищать клеточные структуры от АФК продемонстрирована в целом ряде исследований, наиболее тщательное из которых проведено Б. Эймсом с соавторами (Ames et al., 1981). Известно также, что объединение в геноме дрозофилы дефектов по содержанию урата и супероксиддисмутазе приводит к развитию летального эффекта у имаго (Hilliker et al., 1992). Способность урата защищать

нуклеиновые кислоты применяется на практике. Это вещество входит в состав пропитки наиболее популярного «инструмента» консервации ДНК – FTA-карт.

Наши эксперименты показали (табл. 1), что урат, также как и аллантоин, проявляет антимуtagenную активность практически во всех вариантах опыта. Максимальная активность регистрируется для концентрации  $10^{-3}$  М. Максимальное значение этого показателя (А) для аллантоина регистрируется в концентрации  $10^{-4}$  М. В отличие от урата, его активность сохраняется и при малых концентрациях –  $10^{-9}$ – $10^{-10}$ М.

Таблица 2

Супероксидустраниющая активность урата и аллантоина.

Концентрация, М	Урат	Аллантоин
$10^{-10}$	0,060±0,019	0,058±0,004
$10^{-9}$	0,084±0,012	0,069±0,004
$10^{-8}$	0,224±0,016*	0,089±0,002
$10^{-7}$	0,309±0,013*	0,129±0,012
$10^{-6}$	0,339±0,013*	0,181±0,011
$10^{-5}$	0,401±0,010*	0,171±0,003
$10^{-4}$	0,029±0,007	0,137±0,018*

\* – Отличия между эффектами одинаковых концентраций исследованных веществ статистически значимы (t-критерий  $p < 0,05$ )

Максимальное значение антимуtagenной активности аллантоина превышает аналогичный показатель для урата в 1,37 раза.

Как аллантоин, так и урат, обладают супероксидустраниющей активностью. Для аллантоина увеличение концентрации не приводит к достоверному росту СУА, тогда как для урата обнаружена явная зависимость эффекта от дозы. Максимум супероксидустраниющей активности урат проявляет в концентрации  $10^{-5}$  М, что соответствует физиологической концентрации в спинномозговой жидкости.

Таким образом, урат способен более эффективно, чем аллантоин, «перехватывать» супероксид-анион, проявляя в то же время меньшую способность инактивировать свободнорадикальные продукты реакций Фентона и Габера-Вейсса, ответственных за ДНК-повреждающую активность перекиси водорода. Мочевая кислота, как показано выше, является эффективным перехватчиком гидроксильных и супероксид-радикалов. С повышением концентрации урата вследствие *Uox* — мутаций (Oda et al., 2002; Wu et al., 1992) связывают увеличение продолжительности жизни и снижение уровня возрастных раковых заболеваний у человека (Ames et al., 1981). С другой стороны, в результате атаки мочевой кислоты свободными радикалами образуется аллантоин, обладающий свойствами антиоксиданта, антимутагена и витамина (Гуськов и др., 2002; 2004). Таким образом,



неферментативная генерация аллантаина у видов, потерявших уриказную активность, может отражать развитие адаптационной составляющей окислительного стресса.

В пользу этого предположения говорят данные по антиоксидантной активности смеси, характерной для спинномозговой жидкости человека концентрации урата и в десять раз меньшей концентрации аллантаина —  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М, соответственно (Amorini et al., 2009). Антимутагенная активность такой смеси (несмотря на то, что содержание аллантаина в ней около 10 %) на 33 % выше, чем чистой мочевой кислоты. Подобный эффект синергизма при совместном действии антиоксидантов в физиологических концентрациях согласуется с представлениями о том, что биоантиоксиданты наиболее эффективны в составе природных смесей. В то же время, значение СУА смеси достоверно не отличается от такового для урата —  $0,386 \pm 0,014$ .

Полученные нами данные позволяют высказать предположение о том, что аллантаин может служить в основном для защиты генетического аппарата клетки от АФК, а главной протекторной функцией урата является защита мембран от супероксид-аниона.

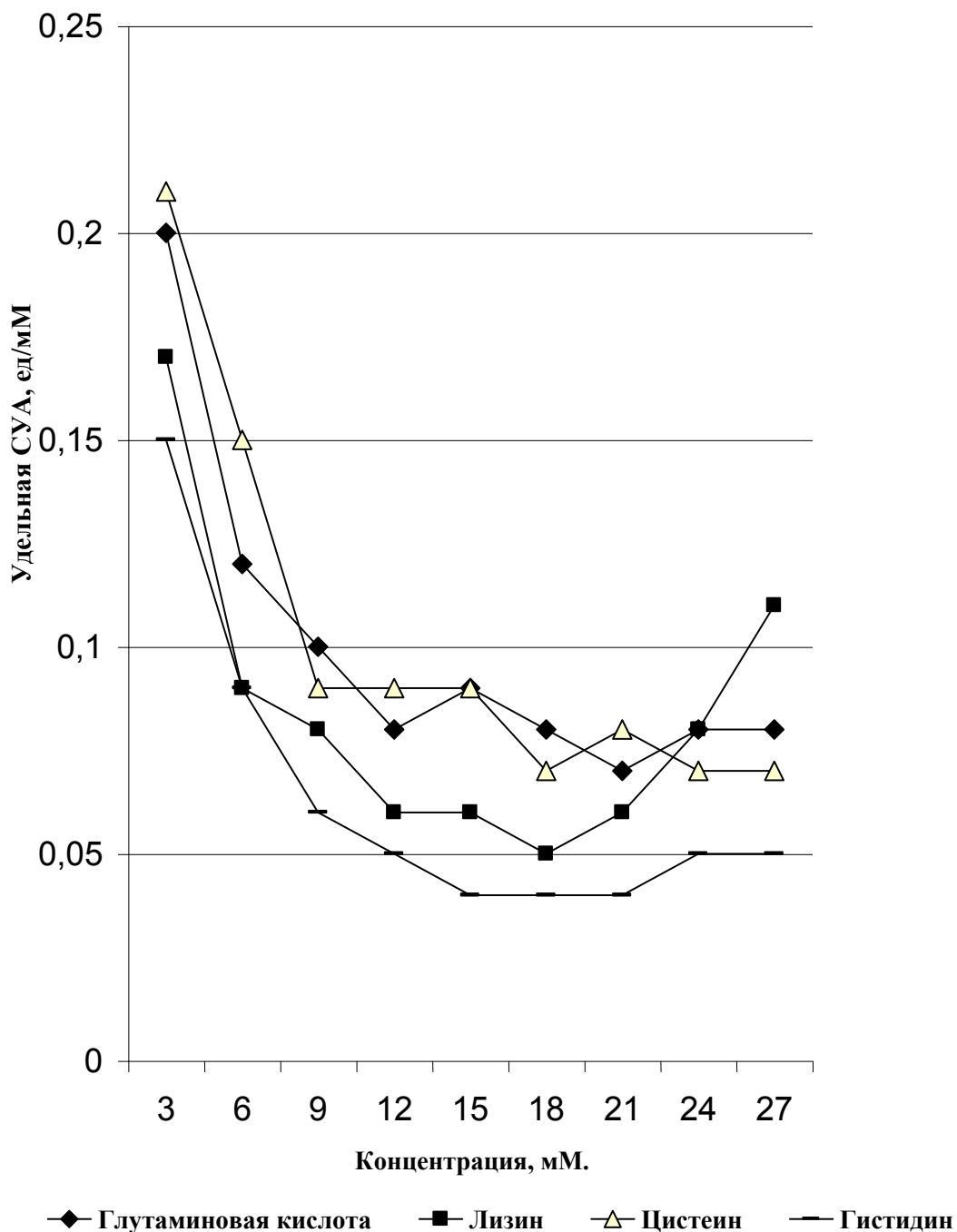
Аминокислоты. Как показали теоретические исследования Корниенко и соавт. (2002), аминокислоты могут быть эффективными перехватчиками супероксид-аниона. Исследование взаимодействия аминокислот с  $O_2^{\cdot -}$  позволит глубже понять механизм развития окислительно-восстановительного дисбаланса в организме при ряде патологий и действии экстремальных факторов среды.

По максимальной СУА, обнаруженной в исследованном диапазоне концентраций, изученные аминокислоты можно разделить на две группы. Максимальной СУА удалось достичь для лизина — 2,89 ед., глутаминовой кислоты — 2,23 ед., цистеина — 1,91 ед. Промежуточное положение занимает гистидин — 1,22 ед. Минимальную СУА проявили треонин, аспарагин, метионин и алифатические аминокислоты (0,81—1,04 ед.). Анализ дозовых зависимостей СУА/концентрация показал, что удельная СУА аминокислот существенно зависит от концентрации.

Данные по удельной СУА представлены на рис. 3. Для большинства изученных аминокислот (гистидин, изолейцин, аланин, треонин, валин, аспарагин) достоверных различий в  $S_{уд}$  не обнаружено, поэтому они представлены на рис. 3 одной кривой. Большую СУА проявляют глутаминовая кислота и цистеин. Для всех вышеназванных аминокислот увеличение концентрации приводит к экспоненциальному понижению СУА с выходом на плато. Аномальная U-образная зависимость отмечена для лизина. Такой вид кривых, по нашему мнению, можно объяснить тем, что при концентрациях выше 9 мМ идет образование комплексов, СУА которых ниже, чем у свободных аминокислот, возможно, за счет координационных взаимодействий между кислотными и аминогруппами.

По достижении концентраций, приводящих к образованию таких комплексов, СУА аминокислот будет в большей степени зависеть от свойств их радикалов. Такое предположение позволяет логически увязать аномально

высокую СУА лизина с наличием дополнительной аминогруппы. Данные по СУА лизина явились несколько неожиданными, так как в литературе эта аминокислота не рассматривается в качестве потенциального антиоксиданта, в то время как его максимальная СУА в нашей системе почти в 2,5 раза выше, чем у метионина, который является признанным природным антиоксидантом.



**Рис. 3.** Зависимость удельной супероксидустраивающей активности аминокислот от их концентрации

Сделанные нами выводы были подтверждены проведенными Корниенко (2004) квантовохимическими *ab initio* расчетами в базисе UHF/6-31G\*\* молекулярных комплексов,  $O_2^{\cdot-}$  с протонированным по свободной аминогруппе лизином. В качестве причины высокой супероксидустраняющей активности лизина может быть названо образование устойчивого межмолекулярного комплекса, сопровождающееся переносом протона с аминокислоты на анион-радикал кислорода. Именно такой механизм процесса позволяет уменьшить энергию, необходимую для восстановления  $O_2^{\cdot-}$  до  $H_2O_2$ .

В заключение отметим, что аллантаин и природные аминокислоты не токсичны, не разрушаются в пищеварительном тракте, хорошо растворимы в воде и могут быть введены в организм в значительных количествах, что облегчает их использование для фармакологической коррекции кислородзависимых патологических состояний.

Определенное прикладное значение может иметь обнаруженная нами (Сазыкина и др., 2009) способность аллантаина снижать генотоксичность такого распространенного индуктора АФК, как ультрафиолет длиной волны 300-400 нм, характерный для солнечного света у земной поверхности.

Современные представления о вкладе различных повреждений ДНК в генотоксичность данного типа излучения достаточно противоречивы. С одной стороны, есть данные о его способности генерировать пиримидиновые димеры. С другой стороны, эта активность зависит от антиоксидантного статуса клетки (подавляется альфа-токоферолом). Кроме того, достаточно хорошо показана способность УФ длиной волны 300-400 нм увеличивать внутриклеточное содержание супероксид-аниона. Обнаруженный нами эффект 55% снижения уровня SOS-индукции после облучения *E. coli* в присутствии аллантаина может служить дополнительным аргументом в пользу прооксидантного механизма. В любом случае, полученные данные позволяют поставить вопрос об испытании солнцезащитных свойств аллантаина на более близких к человеку моделях.

### **Уровень биополимеров (нуклеиновых кислот): различия в чувствительности РНК, линейной и кольцевой ДНК к индукторам окислительного стресса, замыкание в кольцо как защитный механизм**

Сравнение условий, в которых обнаруживаются линейные и ковалентно замкнутые кольцевые ДНК, позволяет сделать предположение о том, что в основе их различной распространенности лежит различная устойчивость к повреждающим агентам, в том числе к активным формам кислорода.

Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК преимущественно обнаруживаются в компартментах, содержащих клеточные системы переноса электронов, способные интенсивно генерировать АФК. Линейная ДНК обнаруживается только в структурах, изолированных мембранами от каких-либо источников АФК и других повреждающих агентов.

Эксперименты показали, что 20–60-минутная экспозиция при давлении 0,7 МПа чистого кислорода не вызывает достоверной деградации ни одной из исследованных форм нуклеиновых кислот. Деструктивного действия супероксид-аниона на препараты нуклеиновых кислот обнаружить в пределах использованной экспериментальной схемы также не удалось.

Данные по деградации хромосомной ДНК и суммарной РНК в условиях аутоокисления солянокислого гидроксиламина в присутствии ионов меди в бикарбонатном и глициновом буферах представлены на рис. 4.

Из приведенных данных следует, что в условиях генерации АФК с увеличением концентрации  $\text{CuSO}_4$  до 14 мМ в обеих буферных системах происходит практически линейное увеличение деградации как хромосомной ДНК, так и суммарной РНК.

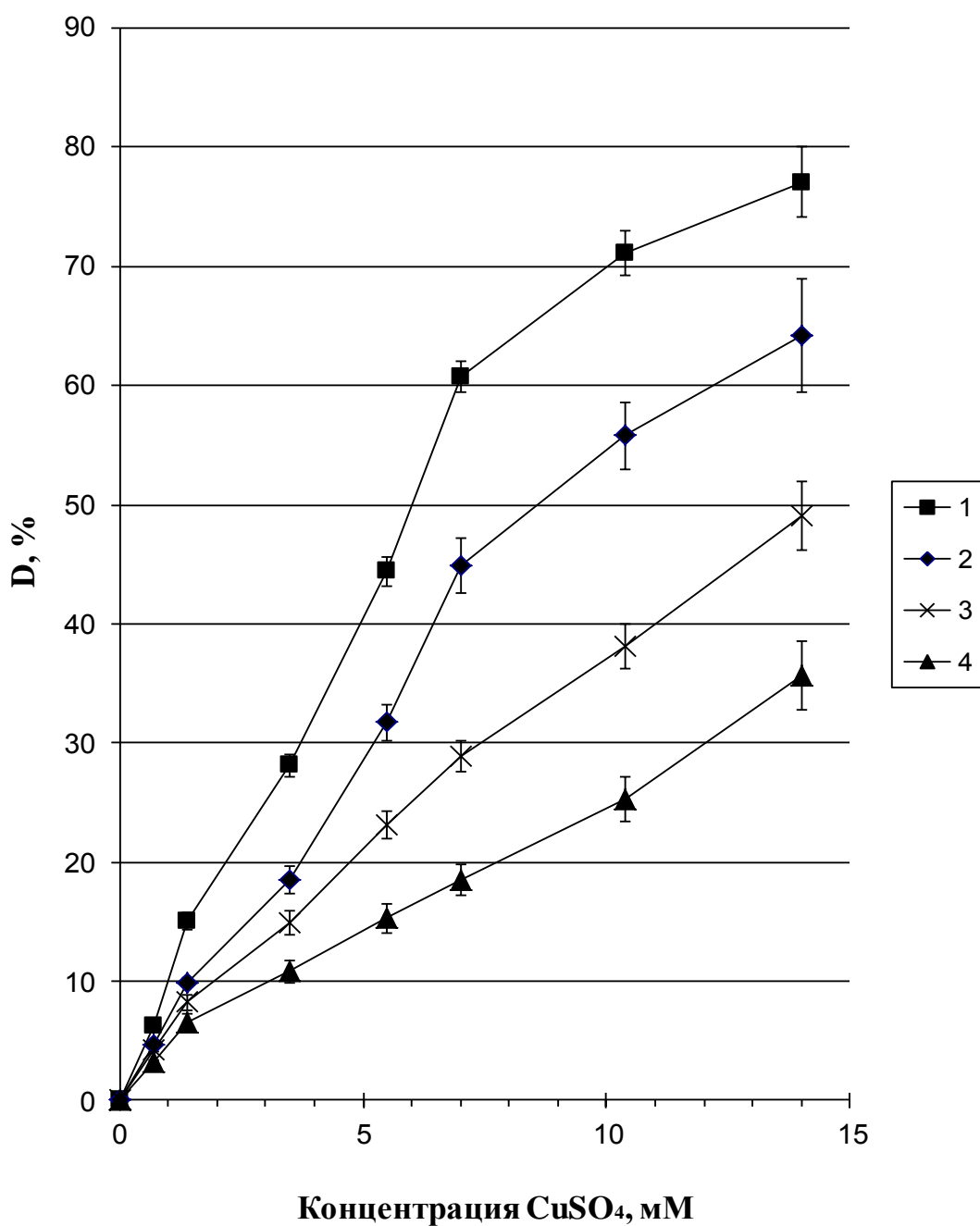
Деградация РНК, в среднем, идет эффективнее по сравнению с линейной хромосомной ДНК (на 20 % в глициновой и на 40 % в бикарбонатной буферной системе). Для бикарбонатной системы генерации активных форм кислорода характерен больший деструктивный эффект.

На рис. 5 приведены данные по деградации ковалентно замкнутой кольцевой ДНК плазмиды pBR322 в различных условиях. На рисунке видно, что при концентрациях меди 5–10 мМ, вызывающих ~50 % разрушение линейной ДНК (рис. 4), деградация ковалентно замкнутой ДНК отсутствует.

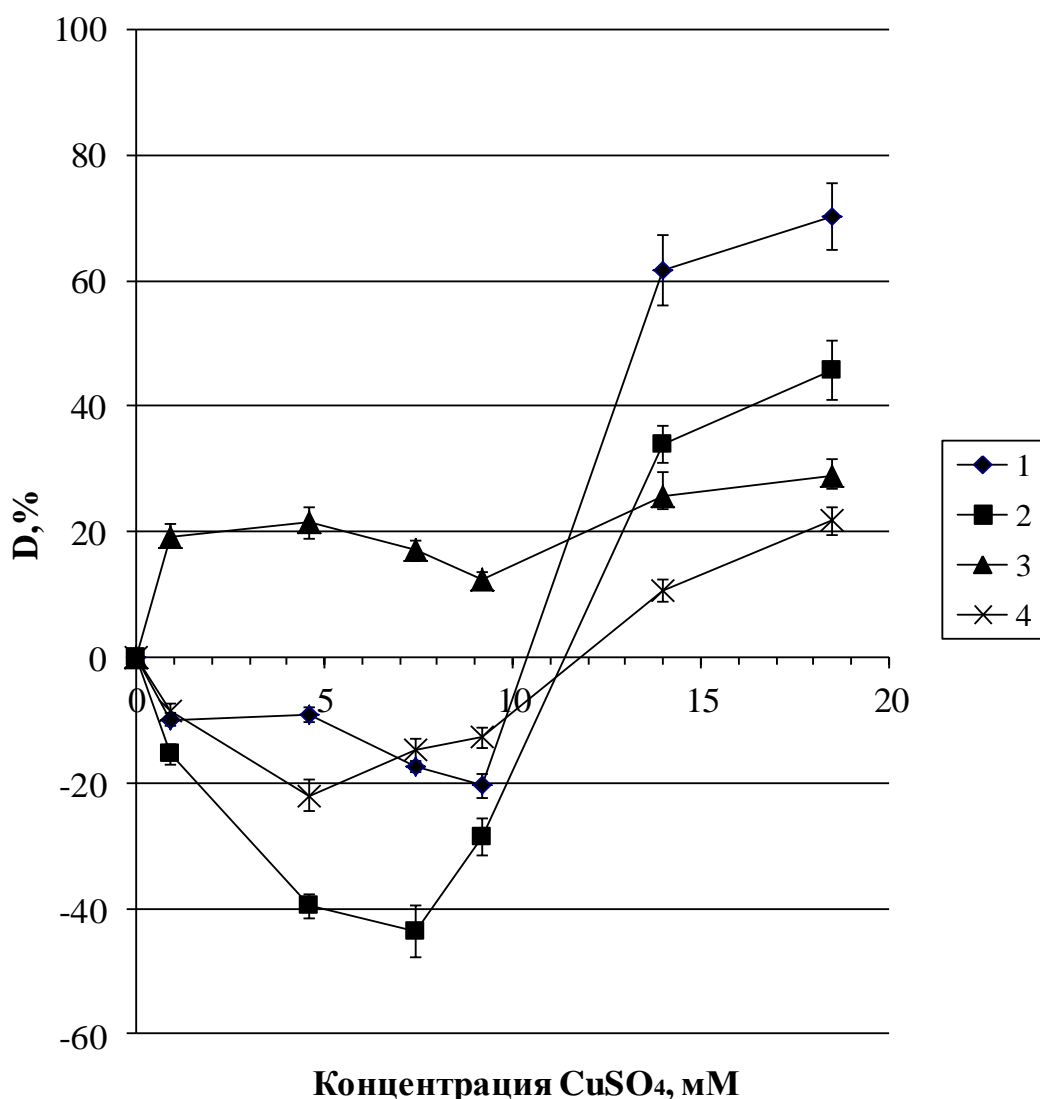
При рассмотрении зависимостей степени деградации нуклеиновой кислоты от концентрации ионов меди, обращает на себя внимание факт увеличения флуоресценции исследуемых образцов ковалентно замкнутых кольцевых молекул ДНК, что проявляется в появлении отрицательных значений D.

По-видимому, этот эффект может объясняться появлением однонитевых разрывов в ковалентно замкнутых кольцевых молекулах ДНК после стадии щелочного расплетания, что ведет к устранению топологических ограничений при взаимодействии интеркалирующего лиганда (бромистого этидия) с молекулами ДНК. Такие разрывы возникают при ренатурации ковалентно замкнутой ДНК после инкубации при щелочных рН и последующей нейтрализации (Kieser, 1984).

Интересным представляется феномен индукции разрывов ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ионами меди в отсутствие супероксидного аниона. Складывается впечатление, что в различных буферных системах ионы меди вызывают однонитевые разрывы на разных этапах экспериментальной процедуры. Разрывы, индуцируемые медью в бикарбонатном буфере, происходят до стадии денатурации/ренатурации и успевают привести к расплетанию ковалентно замкнутой кольцевой ДНК, в отличие от однонитевых разрывов, происходящих в глициновой системе (рис. 5) после стадии щелочного расплетания, в результате чего флуоресценция проб увеличивается вследствие снятия топологических ограничений взаимодействия бромистого этидия с ДНК.



**Рис. 4.** Степень деградации (D) линейной хромосомной ДНК и суммарной РНК в условиях генерации активных форм кислорода в зависимости от концентрации CuSO<sub>4</sub>: 1 – РНК в бикарбонатном буфере; 2 – ДНК в бикарбонатном буфере; 3 – РНК в глициновом буфере; 4 – ДНК в глициновом буфере



**Рис. 5.** Степень деградации (D) ковалентно замкнутой кольцевой ДНК плазмиды pBR322 в условиях генерации активных форм кислорода в зависимости от концентрации CuSO<sub>4</sub> и после обработки CuSO<sub>4</sub> без гидроксилamina; 1 - CuSO<sub>4</sub> с гидроксиламином в бикарбонатном буфере; 2 - то же в глициновом буфере; 3 - CuSO<sub>4</sub> без гидроксилamina в бикарбонатном буфере; 4 - то же в глициновом буфере.

Рассматривая результаты экспериментов в целом, необходимо, прежде всего, отметить, что наши данные согласуются с распространенной в настоящее время точкой зрения, согласно которой наибольший вклад в биологическое повреждение вносят гидроксильные радикалы (Rozenberg-Arska et al., 1985; Marnett, 2000; Fridovich, 2000 и др.), так как деструктивный эффект использованной системы генерации супероксидного аниона по отношению к нуклеиновым кислотам проявляется только при введении в

реакционную смесь ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Выраженное защитное действие маннита, обнаруженное в экспериментах с ковалентно замкнутой кольцевой ДНК, также прямо указывает на участие гидроксильных радикалов в возникновении обнаруженных нами однонитевых разрывов. Для линейных форм нуклеиновых кислот значительного защитного эффекта маннита от активных форм кислорода, генерируемых в нашей системе, не обнаружено, что указывает на различие механизмов разрушения кольцевых и линейных форм нуклеиновых кислот.

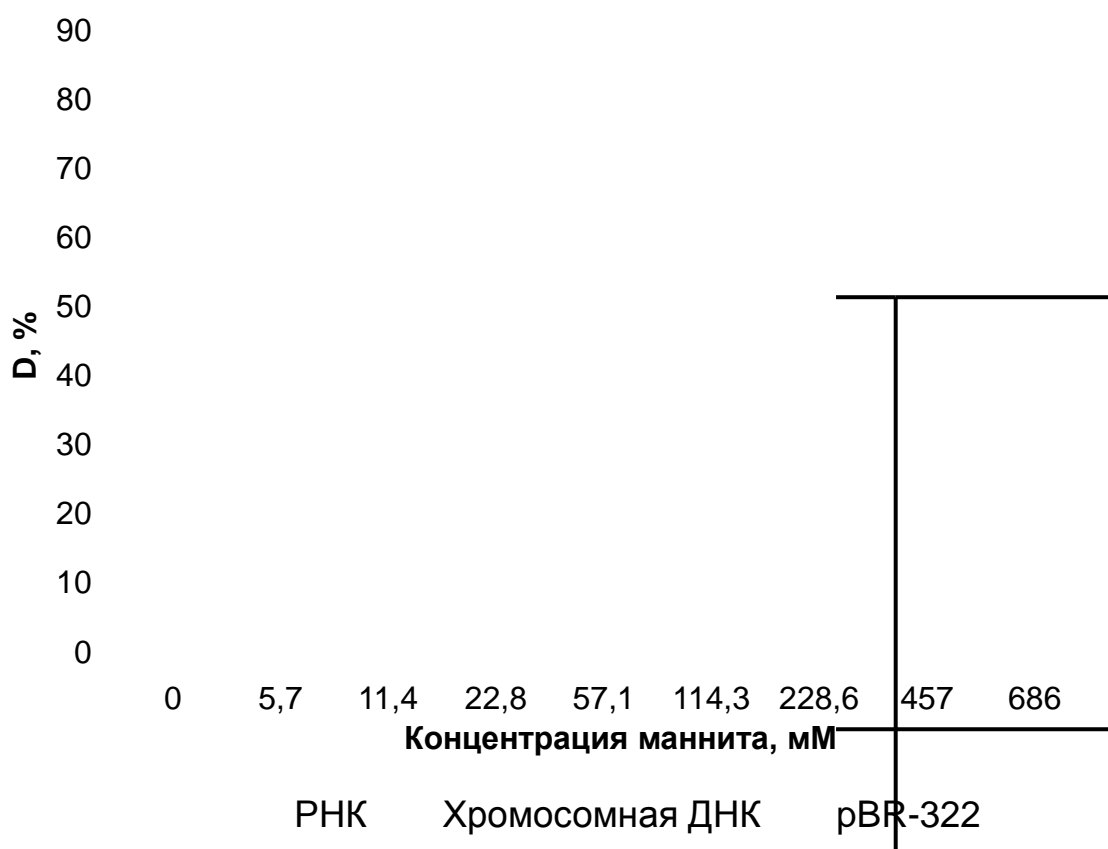
В рамках наших экспериментальных условий с большей эффективностью протекают процессы разрушения линейных молекул нуклеиновых кислот, по сравнению с ковалентно замкнутыми кольцевыми. Для объяснения подобных эффектов мы хотим предложить следующий механизм: замыкание ДНК в кольцо делает менее доступными для повреждающих воздействий высокореактивные 3' и 5' – концы нуклеиновых кислот. Разрушение линейных молекул нуклеиновых кислот АФК, возможно, идет по принципу “концевой атаки” – ферментативного аналога экзонуклеазной активности, а кольцевых молекул – по принципу разрывного действия – ферментативного аналога эндонуклеазной или нисовой активности. При концевой атаке идет связывание ионов, в данном случае  $\text{Cu}^{2+}$ , с 3'- или 5'-концами нуклеиновых кислот с последующим их разрушением гидроксильными радикалами.

Защитный эффект маннита, обнаруженный только для ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (рис. б), можно объяснить образованием высокореактивного комплекса меди с концевыми участками линейной ДНК. По-видимому, различия в устойчивости кольцевых и линейных нуклеиновых кислот объясняются разной эффективностью реакций “концевой атаки” и “разрывного действия”.

В то же время необходимо отметить, что замкнутость – не единственное отличие плазмидной ДНК от хромосомной. Можно предположить, например, влияние степени суперспиральности, химических модификаций нуклеотидов и их последовательности на устойчивость нуклеиновых кислот к активным формам кислорода. Однако результаты подробного исследования разрушения плазмидной ДНК АФК, генерируемые с участием меди, показали, что скорость разрушения плазмид практически не зависит ни от последовательности нуклеотидов, ни даже от присутствия вставок Z-ДНК и крестообразных структур (Reed, Douglas, 1991).

Большая устойчивость ковалентно замкнутых кольцевых ДНК к действию активных форм кислорода позволяет, естественно, с некоторой долей приближения, объяснить ряд важнейших биологических феноменов, а, именно, ответить на вопрос: почему ДНК в одних случаях имеет линейную, а в других - кольцевую конфигурацию? Известно, что кольцевые формы ДНК присутствуют либо у прокариот, где клеточная ДНК соседствует с системами переноса электронов, способными генерировать активные формы кислорода

(Freeman-Bruce , 1984), либо в митохондриях и хлоропластах эукариот, где существуют аналогичные условия.



**Рис. 6.** Зависимость степени деградации (D%) препаратов нуклеиновых кислот в условиях генерации АФК от концентрации маннита.

С различиями в устойчивости к активным формам кислорода связаны, возможно, и различия в эффективности трансформации бактерий линейной и ковалентно замкнутой кольцевой плазмидной ДНК, а также необходимость замыкания фаговых ДНК в кольцо при проникновении в клетку. Известно также, что, хотя нуклеиновые кислоты появились в процессе эволюции еще на восстановительных стадиях биопоэза, при облучении ультрафиолетовым светом даже в этих условиях могут возникать активные формы кислорода (Peshkin, Shlyachova, 1986). Присутствие в первичном бульоне значительного количества ионов металлов переменной валентности должно было локализовать мощные центры источников свободных радикалов и перекисей, эффективно разрушающих линейные формы нуклеиновых кислот. В подобной ситуации наиболее эффективной, если не единственной формой "самозащиты", могло быть образование и селективный отбор кольцевых форм ДНК. Этот способ защиты от активных форм кислорода, возникший до появления кислорода в атмосфере, мог оказаться впоследствии эффективным способом защиты нуклеиновых кислот от окислительного стресса. Наши эксперименты проведены на относительно короткой (4362 п.н.) плазмидной



ДНК, однако известны факты, указывающие на повышенную устойчивость к действию АФК и митохондриальной ДНК, являющейся, в отличие от плазмид, необходимым элементом генетического аппарата эукариотической клетки.

Большая устойчивость кольцевых ДНК к деструктивному действию активных форм кислорода позволяет объяснить широко известный феномен лучшей сохранности митохондриальной ДНК в архивных препаратах, археологических и палеонтологических образцах (Макаров и др. 2001), поскольку АФК - это один из основных деструктивных факторов, действующих на ДНК при ее хранении (Sambrook et al., 1989; Черенкова и др., 2002). Полученные результаты были использованы нами в работе по оптимизации методов сбора и консервации ДНК-содержащих образцов для «Национальной генетической коллекции ДНК-содержащих образцов осетровых рыб», созданной на базе Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, в которых был выявлен оптимальный набор тканей и методов консервации вышеназванных образцов (Войнова и др., 2000; Корниенко и др., 2002; Черенкова и др., 2002).

#### **Клеточный уровень: чувствительность микроорганизмов к индукторам окислительного стресса, участие дыхательной системы дрожжей-сахаромицетов в защите от токсического действия кислорода**

Способность АФК атаковать нуклеиновые кислоты лежит в основе токсического действия, а также генетических эффектов, вызываемых индукторами окислительного стресса. Развивающиеся при этом процессы значительно сложнее, чем взаимодействия АФК/ДНК *in vitro*. Благодаря длительности сосуществования живых систем и кислорода, взаимодействие АФК со структурами клетки опосредовано промежуточными этапами, связанными с защитными системами, внутриклеточными барьерами и т. д.

Результаты многочисленных исследований показали, что штаммы аэробных микроорганизмов, не подвергавшиеся специальной селекции, проявляют значительную, по сравнению с высокоорганизованными эукариотами, устойчивость к токсическому действию кислорода.

В то же время, комбинация аскорбата и металлов оказывает значительное токсическое действие на микроорганизмы даже в условиях нормобарии. Как показано в наших работах (Чистяков и др., 2002; Чистяков, 2003), эффект усиления характерен для мембранотропного действия системы металлы/аскорбат, регистрируемому по подавлению биолюминесценции светящихся бактерий (Bulich, 1979; Чистяков и др., 2002).

Добавление аскорбиновой кислоты в нетоксичной концентрации 20 мг/л усиливает токсичность ионов марганца, железа и меди, но не цинка, для которого при концентрации 0,1 мг/л отмечен достоверный протекторный эффект. Наибольший эффект усиления обнаружен для меди. Концентрация 0,05 мг/л, которая в 20 раз меньше минимальной действующей концентрации для ионов меди без аскорбата, в его присутствии дает почти 100%-ное

подавление свечения культуры бактерий. Мощные синергические эффекты такого рода были зарегистрированы для марганца и двухвалентного железа. Для трехвалентного железа синергический эффект обнаружен только для концентрации 1 мг/л. Различия в способности аскорбата потенцировать мембрано- и ДНК-тропные эффекты металлов, очевидно, объясняются различной доступностью для них соответствующих мишеней. Таким образом, ограничение генетического аппарата клетки гидрофобной мембраной также можно рассматривать как один из первых, пассивных механизмов защиты от АФК.

Низкая чувствительность микроорганизмов к токсическому и ДНК-тропному действию кислорода под давлением, в отличие от других индукторов окислительного стресса, позволяет поставить вопрос о поиске кислород-протекторных механизмов, не связанных непосредственно с перехватом АФК. Согласно предположению Скулачева (1994), таким механизмом может быть индукция дыхания, в результате которой падает внутриклеточное напряжение кислорода. Однако дыхательная система, безусловно, способная «сжигать» кислород, одновременно способна и генерировать АФК. Для изучения этих взаимосвязанных процессов нами была исследована биохимия чувствительных к кислороду мутантов дрожжей-сахаромицетов, имеющих одну из самых эффективных дыхательных систем.

В наших публикациях 1985–1996 гг. был описан феномен чувствительности к гипербарической оксигенации дыхательных мутантов, полученных на основе гаплоидного штамма *Saccharomyces cerevisiae* (Guskov, Chistyakov, 1985; Чистяков, 1986; Чистяков, Водолажский, 1996). В то же время известно, что существующие в природе и используемые в промышленности штаммы дрожжей диплоидны. Диплоидные формы более устойчивы к действию многих экстремальных факторов среды, повреждающих ДНК, за счет значительно меньшей вероятности проявления рецессивных летальных мутаций (Захаров и др., 1980). В данном разделе приведены результаты биохимических исследований серии дыхательных мутантов, полученных на основе диплоидного штамма.

Материалом для выделения дыхательных мутантов служил штамм *Saccharomyces cerevisiae* Д-248 из Петергофской генетической коллекции, использованный нами ранее для исследования токсичности и генотоксичности ГБО для микроорганизмов (Гуськов и др., 1987). Этот штамм был выбран как несущий мутацию *ade2-278*, придающую колониям красную окраску, что облегчает выделение дыхательных мутантов.

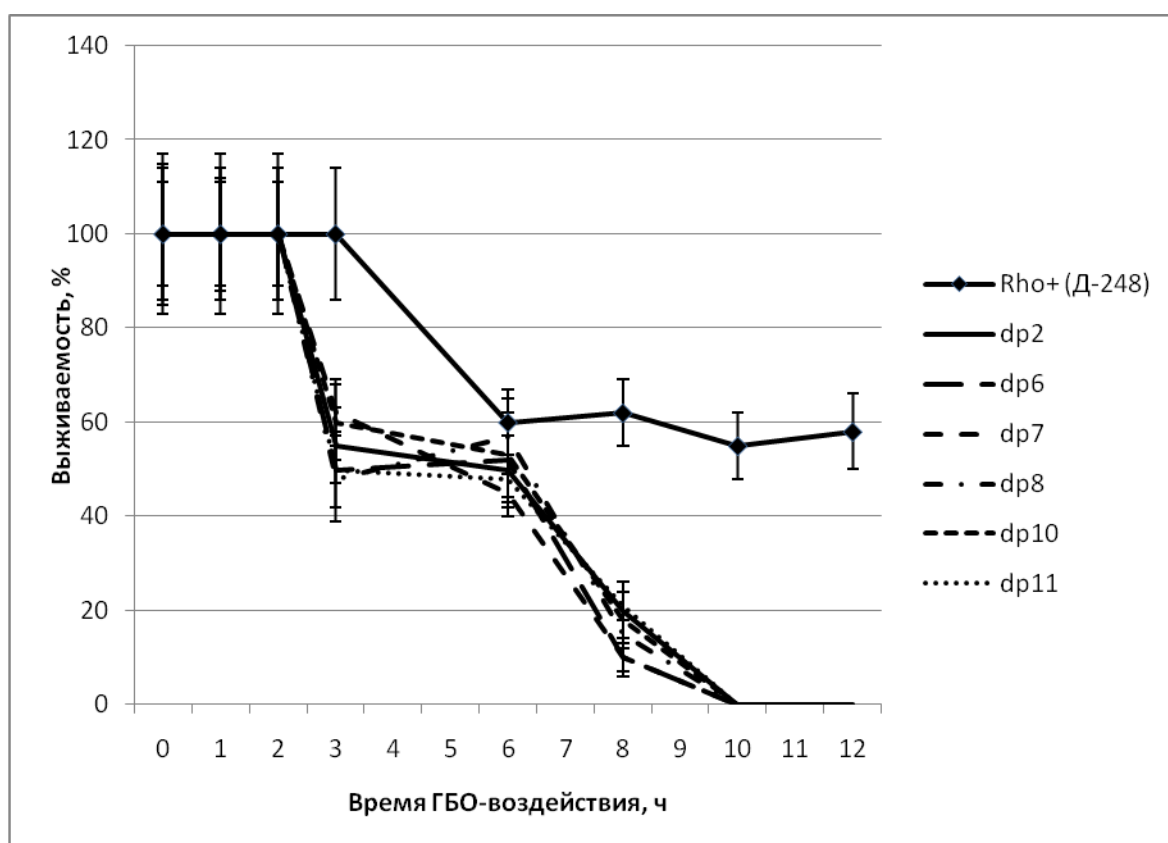
Для получения дыхательных мутантов была использована методика, основанная на обработке дрожжей бромидом этидия. По данным авторов методики (Meyer, Whittaker, 1977), выделенные при помощи бромида этидия дыхательные мутанты дрожжей полностью теряют митохондриальную ДНК, т.е. являются  $\rho^0$ .

Исследование чувствительности к ГБО 25 диплоидных дыхательных мутантов, независимо выделенных под действием бромида этидия, показало,

что, в отличие от исходного штамма, все они полностью гибнут после 22-часовой обработки кислородом при давлении 0,7 МПа.

Шесть независимо выделенных дыхательных мутантов были использованы для исследования их биохимических характеристик в связи с чувствительностью к ГБО.

Как видно на рис. 7,  $\rho\text{ho}^-$  мутанты, полученные на основе диплоидного штамма дрожжей, отличаются чувствительностью к кислороду под давлением. Трехчасовая обработка дыхательных мутантов ГБО приводит к статистически значимому падению выживаемости. Выживаемость штамма Д-248 при этих условиях – 100%. Десятичасовая обработка ГБО приводит к полной гибели  $\rho\text{ho}^-$ , выживаемость исходного штамма – 60%.



**Рис. 7.** Выживаемость исследованных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* после воздействия ГБО при давлении 0,7 МПа

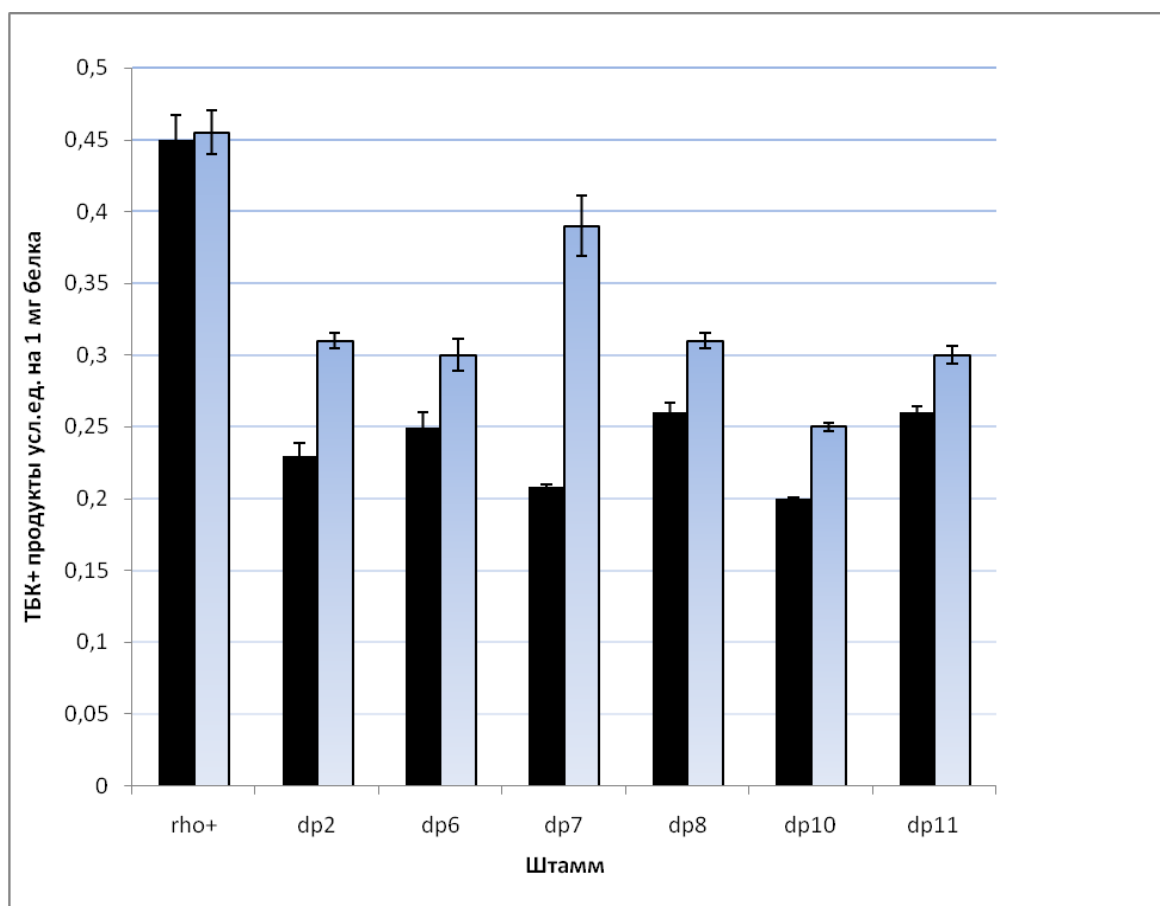
Двухчасовая экспозиция при давлении 0,7 МПа была выбрана нами для биохимических исследований как подпороговая по выживаемости для всех штаммов.

Существование различий по выживаемости после ГБО для  $\rho\text{ho}^-$  и дикого штамма и отсутствие таких различий между дыхательными мутантами хорошо согласуется с данными по содержанию в них ТБК-положительных продуктов (рис. 8). Этот параметр широко используется в качестве показателя уровня окислительного стресса. Содержание ТБК-положительных продуктов у исследованных мутантов в норме не превышает его содержания у дикого штамма —  $0,450 \pm 0,017$  усл. ед./мг белка. Средняя

величина содержания ТБК-положительных продуктов у дыхательных мутантов составляет  $0,235 \pm 0,026$  усл. ед./мг белка.

После ГБО в исследованной нами дозе уровень ТБК-положительных продуктов статистически значимо возрастал для всех дыхательных мутантов, но не для исходного штамма. Увеличение этого показателя варьирует от 88 % у штамма dp7 до 15 % у штамма dp11.

Средний рост уровня ТБК-положительных продуктов у дыхательных мутантов составляет  $37 \pm 11$  %. Судя по этому показателю, перекисное окисление липидов стимулируется при ГБО у всех исследованных дыхательных мутантов, но остается на уровне контроля у дикого штамма. Данный факт указывает на бóльшую доступность мембран дыхательных мутантов для деструктивного действия кислорода, либо на бóльшую интенсивность продукции АФК.



**Рис. 8.** Содержание ТБК-положительных продуктов у  $\rho^+$  и  $\rho^-$  штаммов *S. cerevisiae* в норме (темные прямоугольники) и после ГБО (светлые прямоугольники)

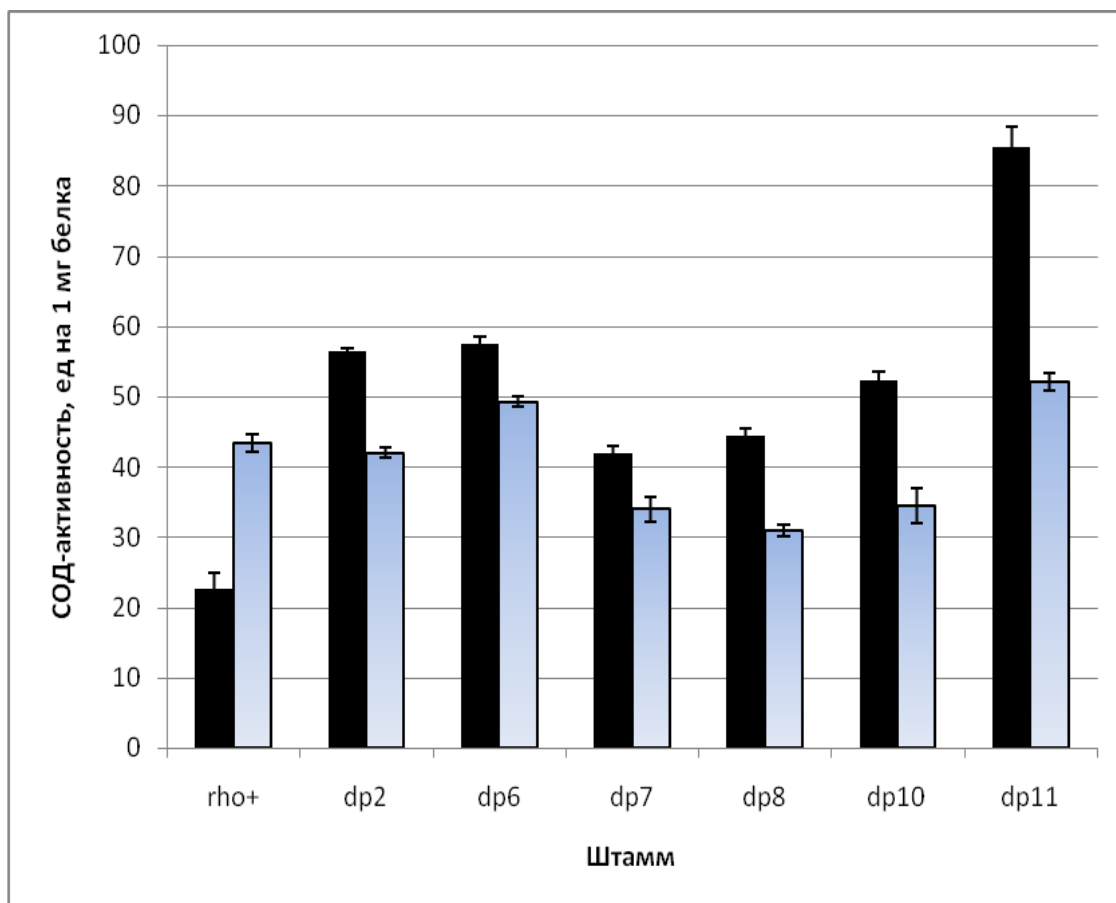
Повышенный, по сравнению с  $\rho^-$ , уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) у дикого штамма связан, очевидно, с анаэробным характером метаболизма у  $\rho^-$  и свидетельствует о том, что при нормоксии образование значительной части продуктов ПОЛ связано с функционированием дыхательной системы.

Способность дыхательной системы дрожжей быть эффективным генератором АФК подтверждена данными работы (Guidot et al., 1993), где показано, что дыхательные мутанты дрожжей ( $\rho^0$ ), в отличие от  $\rho^+$ , способны расти после полной потери медноцинковой супероксиддисмутазы.

Предположение об участии соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в летальном действии ГБО на дрожжевую клетку, нашими данными не подтверждается, так как, несмотря на рост после ГБО, уровень этого показателя у штаммов  $\rho^-$  ниже, чем у  $\rho^+$ .

Важнейшим показателем, отражающим работу кислород-протекторных систем клетки, является активность ферментов, способных перехватывать активные формы кислорода: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы (рис. 9, 10, 11).

Определение активности СОД у диплоидных штаммов показало, что этот показатель существенно (в 2—4 раз) меньше у дикого штамма, чем у  $\rho^-$  (рис. 9). Максимальная суммарная супероксиддисмутазная активность в норме отмечена для штамма dp11 ( $85,4 \pm 3$  ед/мг белка).



**Рис. 9.** Супероксиддисмутазная активность  $\rho^+$  и  $\rho^-$  штаммов в норме (темные прямоугольники) и после ГБО (светлые прямоугольники).

Минимальная супероксиддисмутазная активность при нормоксии у дикого штамма —  $25,7 \pm 2,2$  ед/мг белка. После воздействия ГБО в дозе 20,7 МПа, супероксиддисмутазная активность дикого штамма индуцируется и достигает  $43,4 \pm 1,3$  ед/мг белка (увеличение в 1,7 раза). У дыхательных

мутантов активность этого фермента падает в среднем на 27 %. Максимальное падение активности СОД характерно для штамма dp11 и составляет 39 %.

Повышенное содержание СОД у  $\rho\text{ho}^-$  объясняется, по-видимому, тем, что супероксиддисмутаза берет на себя функции каких-то других, нефункционирующих компонентов системы защиты от кислорода, причем активность СОД у  $\rho\text{ho}^-$  максимальна, и не может больше индуцироваться при увеличении содержания супероксид-аниона под действием ГБО.

При исследовании гаплоидных штаммов наблюдалась аналогичная картина, за исключением того, что различия между диким типом и  $\rho\text{ho}^-$  были значительно больше, максимальное превышение было семикратным; более выраженными были и различия между штаммами, дефицитными по дыханию.

Примечательно, что максимальное превышение супероксиддисмутазной активности у  $\rho\text{ho}^-$ , по сравнению с диким штаммом (в 4 раза у диплоидных штаммов и в 7 раз у гаплоидных (Чистяков, Водолажский, 1996), близко к данным по увеличению содержания СОД при росте дрожжей-сахаромицетов в атмосфере чистого кислорода (в 6,5 раза) (Gregory et al., 1974). Эти данные подтверждают наше предположение о максимальном синтезе СОД у  $\rho\text{ho}^-$  при нормоксии. Уменьшение активности супероксиддисмутаза является следствием инактивации этого фермента перекисью водорода (Фридович, 1979; Гоготов, 1981; Imlay, 2008) и, возможно, подавлением синтеза белка  $\rho\text{ho}^-$  под действием ГБО (Brown et al., 1979).

Очевидно, что различия по активности данного фермента не могут лежать в основе различий по выживаемости, что, однако, ни в коей мере не противоречит представлениям о супероксиддисмутазае, как одном из основных элементов системы защиты от кислорода.

По суммарной каталазной активности между исходным диплоидным штаммом и  $\rho\text{ho}^-$  нет таких очевидных различий, как для супероксиддисмутаза (рис. 10). Максимальная каталазная активность отмечена для штаммов dp6 и dp7. Удельная каталазная активность штамма дикого типа и мутантов dp8 dp10 составляет 240–260 ед/мг белка. Штаммы dp2 и dp11 в норме имеют минимальную активность каталазы  $207 \pm 12$  и  $220 \pm 8$  ед/мг белка, соответственно. У штаммов dp7, dp8 и dp11 после обработки ГБО активность каталазы статистически значимо не изменяется, в то время как у штамма дикого типа она уменьшается на 17 %, у штаммов dp2, dp6, dp10 на 16 %, 32 % и 15 %, соответственно. В среднем снижение уровня активности каталазы для дыхательных мутантов составляет  $10,5 \pm 5,2\%$ . Индукции каталазы ни в одном случае не обнаружено.

Падение каталазной активности после ГБО, очевидно, объясняется способностью супероксид-аниона инактивировать этот фермент (Shimizu et al, 1984; Fridovich, 1999). Для гаплоидных штаммов нами ранее была получена качественно сходная картина. Для гаплоидных  $\rho\text{ho}^-$  были характерны большой размах вариаций между штаммами и более выраженное

подавление активности каталазы после ГБО.

Различия между исследованными нами диплоидными штаммами по суммарной пероксидазной активности сходны с таковыми для каталазы (рис. 10, 11).

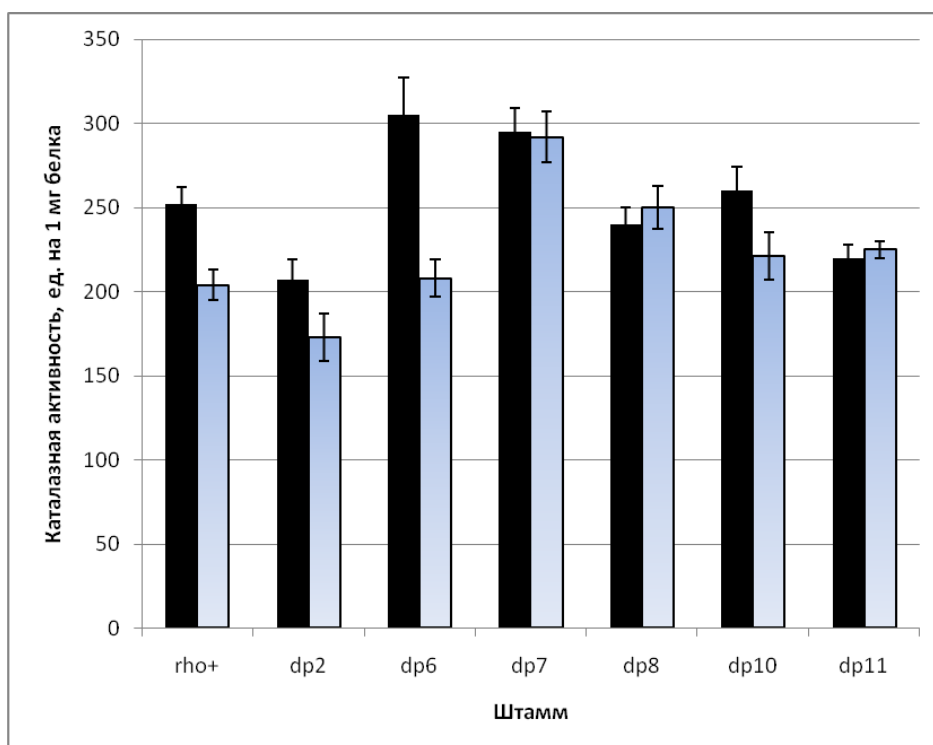


Рис. 10. Каталазная активность  $\rho^+$  и  $\rho^-$  штаммов в норме (темные прямоугольники) и после ГБО (светлые прямоугольники).

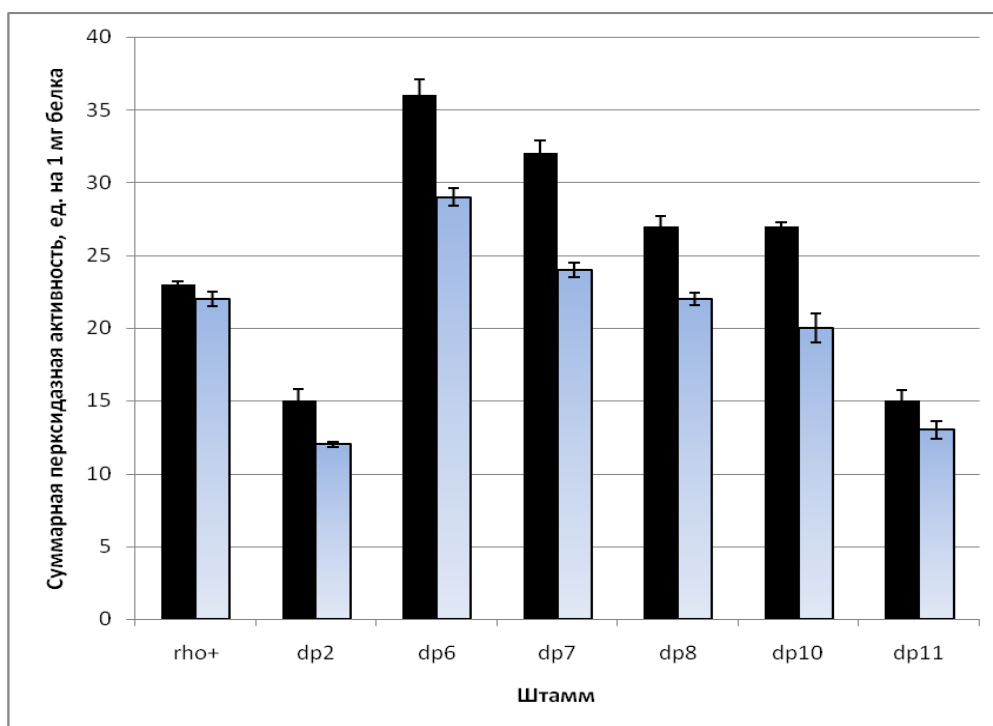


Рис. 11. Суммарная пероксидазная активность  $\rho^+$  и  $\rho^-$  штаммов в норме (темные прямоугольники) и после ГБО (светлые прямоугольники).

Между этими показателями для различных штаммов существует тесная корреляция ( $r=0,95$ ). При нормоксии максимальная пероксидазная активность, характерная для штаммов  $dp6$  и  $dp7$  —  $36,0 \pm 1,1$  и  $32 \pm 0,9$  ед/мг белка, соответственно. У остальных штаммов этот показатель в пределах 23—15 ед/мг белка. После воздействия ГБО в дозе 0,7 МПа 2 часа наблюдалось статистически значимое снижение удельной пероксидазной активности характерное для всех штаммов, кроме дикого штамма и  $dp11$ . В среднем для дыхательных мутантов величина этого показателя снижается на  $19 \pm 4\%$ .

Отсутствие индукции каталазы и пероксидазы ГБО, а также то, что их активность у некоторых дыхательных мутантов, чувствительных к ГБО, выше или равна таковой для дикого штамма, указывает на то, что различия по активности этих ферментов, так же как и СОД, не играют существенной роли в развитии ГБО-чувствительности  $rho$ - штаммов.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что наиболее вероятное объяснение обнаруженных фактов может быть дано в рамках гипотезы Скулачева (1994) о том, что основой кислородпротекторного действия дыхательной системы является понижение внутриклеточного  $pO_2$  за счет связывания растворенного внутри клетки кислорода. В работе (Скулачев, 1996) приведен ряд примеров существования такого механизма у некоторых микроорганизмов, в частности, у некоторых азотфиксирующих бактерий. Логично предположить, что такая "побочная" функция дыхания (Скулачев 1994), не требующая никаких дополнительных механизмов, может эффективно осуществляться и у дрожжей, имеющих одну из самых мощных дыхательных систем среди эукариот (Берри, 1985).

Однако дыхательная система является одновременно и главным внутриклеточным генератором АФК. Соотношение защитного эффекта дыхания и деструктивного действия АФК для каждой экспериментальной модели индивидуально. Этим можно объяснить обнаруженную Озавой и сотрудниками низкую чувствительность к 95% кислороду линий фибробластов, не имеющих митохондрий ( $p^-$ ), по сравнению с дикими ( $p^+$ ) (Скулачев, 1996). После трех дней инкубации в условиях гипероксии большинство  $p^+$  клеток погибло, в то время как выживаемость  $p^-$  была около 80 %. Очевидно, в данном случае причиной гибели клеток была генерация АФК дыхательной цепью митохондрий, о чем свидетельствует накопление делеций в митохондриальной ДНК выживших  $p^+$  клеток.

Можно предположить, что «древнейшая», «первичная в эволюционном плане» (Скулачев, 1994) функция дыхания мобилизуется клеткой в наиболее экстремальных состояниях, в частности, при действии высоких давлений чистого кислорода. В пользу этого предположения говорят представленные данные, свидетельствующие о том, что наличие или отсутствие митохондрий у различных штаммов дрожжей является фактором, предопределяющим различия в выживаемости клеток после действия токсических режимов ГБО (2 ч, 0,7 МПа). Различия по таким показателям, как уровень ПОЛ, активность



СОД, каталазы и пероксидазы, сами по себе, без анализа состояния митохондриальной системы, не в состоянии играть существенную прогностическую роль, хотя и необходимы для объяснения некоторых механизмов реализации защиты клеток от АФК.

Данный вывод применим не только к гаплоидным, но и к диплоидным штаммам дрожжей. Причем если первые существуют, в основном, как исследовательский инструмент, то вторые составляют основу природного разнообразия дрожжей, а также широко эксплуатируются человеком в биотехнологических процессах.

### **Ткани реликтовых видов как источник высокоэффективных смесей антиоксидантов**

Практическим следствием успехов в исследовании механизмов генерации АФК и защиты от них стали многочисленные попытки использования антиоксидантов для повышения адаптационных возможностей человека и животных, профилактики и лечения заболеваний. Высокая сложность естественных антиоксидантных механизмов, их системный характер, определяет тот факт, что одним из основных путей получения препаратов, способных корректировать неблагоприятные проявления свободнорадикальных реакций *in vivo*, является использование сложных смесей антиоксидантов, различные компоненты которых должны активировать разные защитные механизмы.

Усложнение воздействия позволит гармонизировать взаимодействие с клеточной антиоксидантной системой. Здесь можно надеяться на положительное следствие высокой сложности системы защиты от кислорода

Наряду с конструированием таких смесей из отдельных веществ, рациональные принципы которого в настоящее время не сформулированы, можно воспользоваться природными смесями – экстрактами из растений, животных и микроорганизмов. Причем, чем сильнее выражен в системе антиоксидантной защиты неспецифический компонент, тем больше вероятность сохранения ее активности при экстракции.

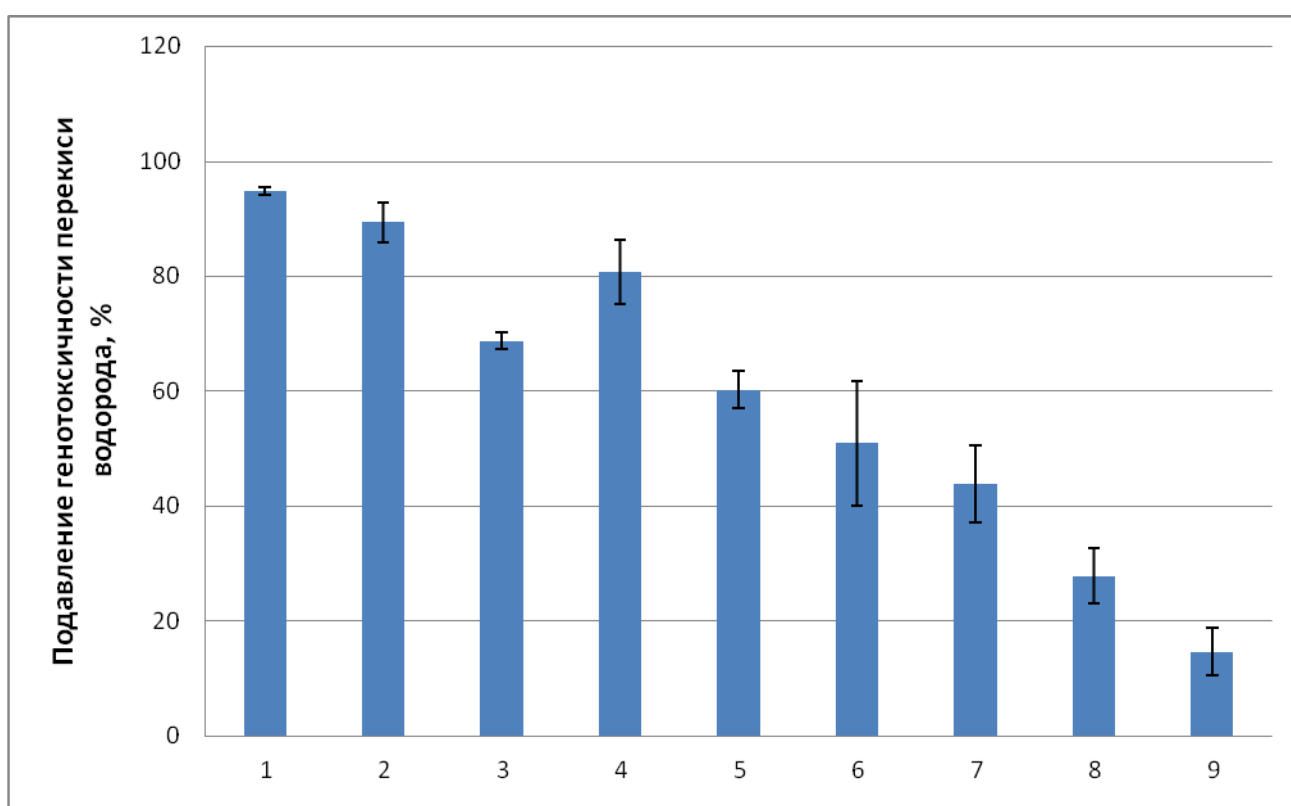
Увеличение специфичности, в том числе числа ферментов, участвующих в осуществлении биохимических функций - одна из основных закономерностей в эволюции живых организмов, поэтому высокую активность антиоксидантной защиты следует ожидать у древних, реликтовых форм.

Общеизвестно, что продолжительность существования различных таксонов значительно отличается (Гуськов, 1999, Жданов, 2000). Примером «эволюционного долгожительства» могут быть осетровые, которых в наши дни зачастую называют «живыми ископаемыми» (Макаров, Житенева, 2000).

Логично предположить, что представители долгоживущих видов обладают рядом древних адаптационных механизмов, позволяющих сохранить генофонд вида. Один из них может быть основан на защите ДНК от гидроксильного радикала при помощи низкомолекулярных антимуtagenов.

На рис. 12 представлены данные по антиоксидантному действию экстрактов исследованных тканей. Ткани самцов и самок осетра по исследованному показателю достоверно не отличались, поэтому мы сочли возможным объединить их в одну выборку. Для чехони и пиленгаса половых различий по исследованному признаку также не отмечено. Все исследованные особи тарани были самками.

Как видно на рис. 12, антиоксидантная активность экстрактов исследованных тканей костистых рыб существенно ниже, чем у осетровых. Результаты, полученные для печени и гонад осетра, в 1,9 и 2,0 раза, соответственно, превышали таковую для чехони. Для тарани превышение составило 3,4 и 6,3 раза, для печени пиленгаса - 1,6 раза.



**Рис. 12.** Антиоксидантная активность экстрактов тканей рыб; 1 – русский осетр, печень, 2 – русский осетр, гонады, 3 – русский осетр, мышцы, 4 – севрюга, хрящ, 5 – пиленгас, печень, 6 – чехонь, печень, 7 – чехонь, гонады, 8 – тарань, печень, 9 – тарань, гонады.

Согласно данным литературы (Зиновьев и др., 1998; Kornienko et al., 1999; Дудкин, 2000; 2001; 2002), ни по уровню активности ферментов антиоксидантной защиты, ни по содержанию токоферола и других низкомолекулярных антиоксидантов осетровые не отличаются принципиально от костистых рыб Азовского моря.

Можно предположить, что наблюдаемые различия по способности исследованных экстрактов защищать ДНК от перекиси водорода связаны именно с развитием неспецифических защитных механизмов.

Оценить эффективность антимуутагенов, содержащихся в органах и тканях осетровых рыб, можно путем сравнения полученных эффектов с антимуутагенными эффектами ряда синтетических и природных антиоксидантов.

Для большинства антиоксидантов характерны колоколообразные зависимости доза-эффект, существует максимально эффективная концентрация, уменьшение или увеличение которой одинаково приводит к ослаблению эффекта. Как показали наши исследования (Чистяков и др., 2001), эта закономерность сохраняется и для антимуутагенной активности антиоксидантов. Поэтому максимальная величина эффекта может служить показателем «силы» антимуутагенного действия антиоксиданта. Ранее было показано, что этот показатель для экстрактов тканей русского осетра превышает максимальные эффекты, полученные для токоферола и других антиоксидантов (Чистяков и др., 2001), что является доказательством существования у осетровых весьма эффективной системы антиоксидантов, способных защищать генетический аппарат.

Идентификация веществ, ответственных за антимуутагенный потенциал тканей осетровых рыб, - это отдельная, весьма актуальная задача. Клеточная система защиты от ДНК-тропных воздействий включает ряд как ферментативных, так и неферментативных механизмов. Низкомолекулярные антиоксиданты - это лишь часть этой системы (Ames, 1989). Однако мы полагаем, что развитие этой части отражает эволюцию целого и, следовательно, позволяет получить представление о работе важнейшей части генетического аппарата гидробионтов в натуральных условиях.

Молоки осетровых рыб используются в настоящее время в качестве сырья для производства препарата «Деринат». Наши данные позволяют надеяться, что и другие их органы могут быть использованы для получения биологически активных препаратов, а осетровые рыбы будут служить не только пищевым объектом, но и дополнительным источником веществ, защищающих генетический аппарат человека от деструктивных воздействий экзо- и эндогенных факторов, а также объектами, позволяющими изучать принципы «природного дизайна» эффективных антиоксидантных смесей.

### **Адресованное в митохондриях производное пластохинона как протектор от повреждения ДНК активными формами кислорода**

Согласно современным представлениям, основным источником внутриклеточных АФК являются митохондрии. Адресная доставка в митохондрии антиоксидантов теоретически должна дать возможность, по образному выражению Скулачева, «очистить грязное место клетки», не увеличивая концентрацию антиоксидантов в других компартментах, где такое увеличение может быть бессмысленным или вредным. При этом содержание действующего вещества в пересчете на всю массу клетки будет ничтожно малым, что позволит избежать запуска природных механизмов, компенсирующих изменение антиоксидантного статуса клетки в сторону увеличения.

Под руководством академика Скулачева в 70-е годы XX века были разработаны теоретические основы конструирования липофильных органических катионов, способных накапливаться в митохондриях. По предложению Грина, такие молекулы были названы «Ионами Скулачева».

Попытки использования конструкций на основе трифенилфосфония, «нагруженных» альфа-токоферолом и убихиноном (mitoQ), оказались в целом неудачными из-за низкой терапевтической широты этих соединений. При этом наихудшие результаты были получены для производного токоферола – вещества, специфической функцией которого является защита мембран от свободно-радикального повреждения. Лучшие результаты на клеточных моделях были получены для производного убихинона, антиоксидантная функция которого является дополнительной по отношению к основной – участию в цепи переноса электронов. Однако исследования *in vivo* не выявили серьезных протекторных свойств mitoQ.

В 2003-2005 гг. был синтезирован ряд ионов Скулачева, «нагруженных» пластохиноном - метаболитом хлоропластов, обладающим высокими антиоксидантными свойствами и способностью к восстановлению при взаимодействии с дыхательной цепью митохондрий. Эти вещества показали целый ряд адаптогенных эффектов *in vivo* - от замедления старения до ускорения восстановления сердца, почек и мозга после ишемии-реперфузии. Применительно к теме работы отметим, что ряд веществ (токоферол, убихинон, пластохинон) можно охарактеризовать возрастанием неспецифичности в плане защиты митохондрий от АФК. Таким образом, использование растительного метаболита пластохинона в антиоксидантных конструкциях, предназначенных для животных, можно рассматривать как эксплуатацию его неспецифической антиоксидантной активности.

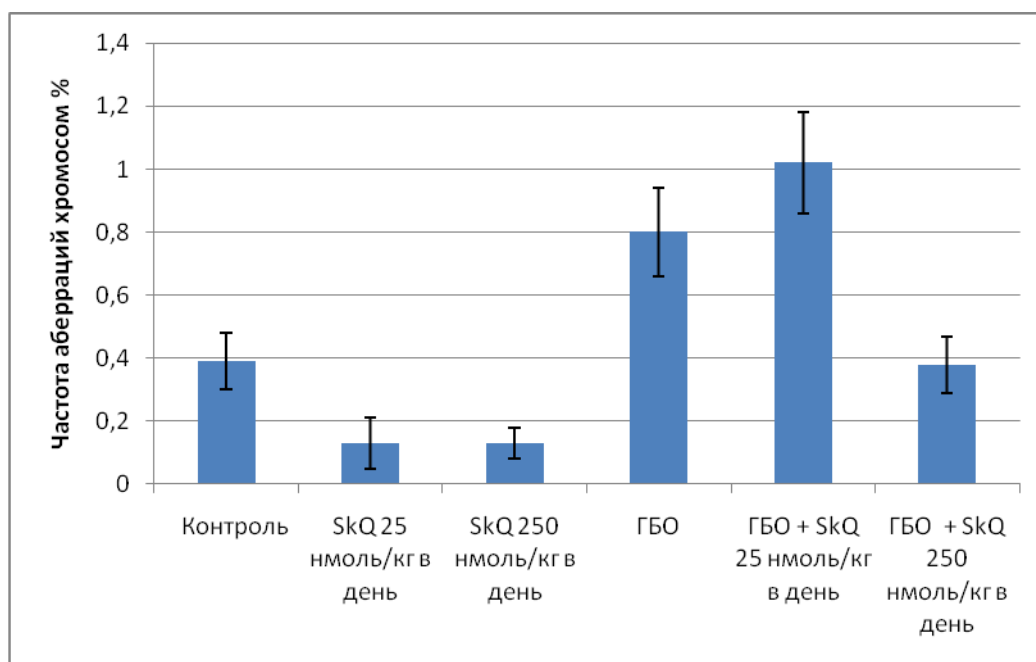
Задачей наших исследований было изучение способности наиболее активного из данной группы соединений – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфония (препарата SkQ1), модифицировать процессы спонтанного и индуцированного мутагенеза с последующим исследованием механизмов выявленных феноменов биохимическими методами.

В качестве мутагена – индуктора окислительного стресса был использован кислород под давлением.

Результаты экспериментов (рис. 13) показали, что двухнедельное введение крысам самцам Wistar препарата SkQ1 в дозах 25 и 250 нМ/кг статистически значительно снижает уровень aberrаций хромосом в эпителиоцитах роговицы глаза более чем в три раза - с 0,37 % до 0,13 % и 0,14 %, соответственно. Большинство перестроек хромосом (60 %) представляют собой хроматидные фрагменты. В целом, 88 % от всех хромосомных aberrаций связаны с фрагментацией ДНК.

После действия использованного режима ГБО - 0,5 МПа 60 мин, в эпителиоцитах роговицы животных регистрировался повышенный уровень aberrаций хромосом, который более чем в 2 раза превышал контрольное значение. При этом наблюдалось увеличение как числа хроматидных фрагментов, так и хроматидных мостов. Статистически значимого

подавления индуцированного ГБО мутагенеза при введении малой дозы SkQ1 (25 нмоль/кг в день), не обнаружено. Более высокая доза SkQ1 (250 нмоль/кг в день) снижала частоту aberrаций хромосом, индуцированную окислительным стрессом, до уровня контроля.



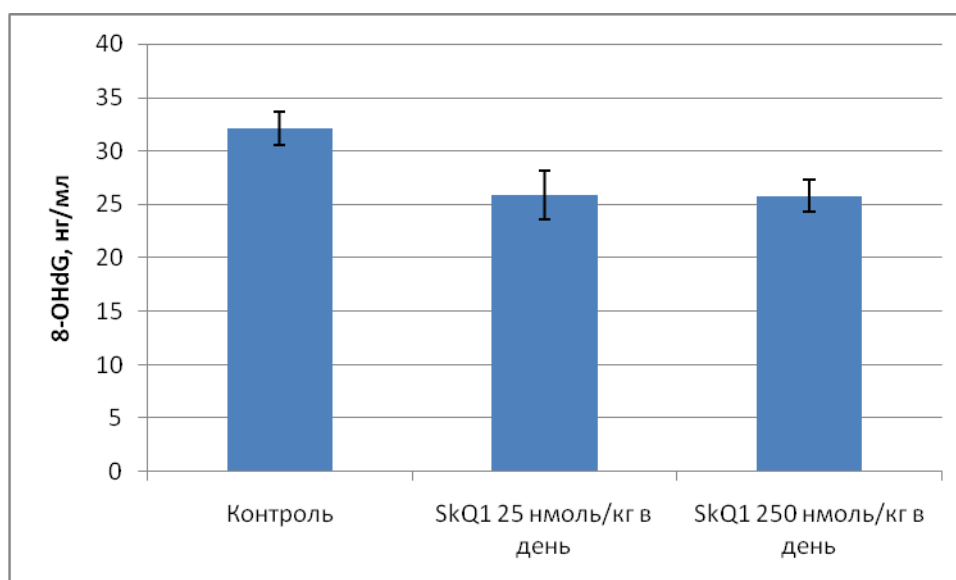
**Рис. 13.** Влияние SkQ1 на фоновую частоту aberrаций хромосом и кластогенный эффект гипербарической оксигенации в эпителиоцитах роговицы глаз крыс.

Пролиферативная активность эпителия роговицы, определяемая по митотическому индексу, в контроле составила  $1,6 \pm 0,2$  %. Обработка ГБО не вызвала статистически значимых изменений пролиферативной активности, митотический индекс составил  $1,8 \pm 0,1$  %. В варианте с введением 25 нмоль/кг в день SkQ1 митотический индекс также не отличался от контроля ( $1,5 \pm 0,12$  %).

При введении большей дозы зарегистрировано достоверное (t-критерий,  $p < 0,05$ ) повышение митотического индекса до 2,7 % (в 1,68 раза). Обработка ГБО на фоне меньшей дозы SkQ1 не вызвала статистически значимых изменений этого показателя.

После обработки ГБО у животных, получавших бóльшую дозу SkQ1, регистрировали статистически значимое уменьшение пула митотических клеток до уровня  $1,2 \pm 0,1$  %, составляющего 75 % от интактного контроля. По современным представлениям, такие отклонения находятся в пределах физиологической нормы.

Результаты определения 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови исследованных животных (рис. 14) показали, что содержание этого вещества в контроле составило  $32,12 \pm 1,55$  нг/мл. Введение животным SkQ1 в дозе 25 нмоль/кг снизило его до  $25,90 \pm 2,26$  нг/мл. Введение большей дозы - до  $25,76 \pm 1,50$  нг/мл.



**Рис. 14.** Содержание 8-ОН-2-дезоксигуанозина (8-ОНdG) в сыворотке крови животных после введения SkQ1. Различия между контрольной и опытными группами статистически значимы (t-критерий,  $p < 0,05$ ).

К настоящему времени накоплен ряд фактов, свидетельствующих о связи мутагенеза и старения. Во-первых, генетические аномалии накапливаются с возрастом. Во-вторых, прогероидный эффект наблюдается практически для всех воздействий, нарушающих работу генетического аппарата, а его выраженность связана со степенью повреждения. В-третьих, прогероидный эффект имеют мутации, связанные с дефектами репарации ДНК. Описание действия любого потенциального геропротектора без учета его влияния на процессы мутагенеза отличалось бы существенной неполнотой. Старение многоклеточных организмов сопровождается, а, возможно, и обеспечивается прогрессирующим уменьшением числа клеток.

Поэтому при изучении влияния препарата SkQ1 на спонтанный мутагенез, руководствуясь формальной логикой, мы обратили внимание на наиболее разрушительные для клетки генетические аномалии – aberrации хромосом, выявляемые в анафазном тесте.

Обе исследованные дозы SkQ1 вызывают снижение спонтанного уровня таких событий. Этот феномен может быть вызван разными факторами. Образование хромосомных aberrаций - процесс, который осуществляется десятками ферментов с использованием энергии АТФ. Поэтому, в принципе, снижение их частоты может быть проявлением угнетения метаболизма. Считать вклад такого механизма в развитие наблюдаемого феномена незначительным позволяют данные по пролиферации. Ни одна из доз, подавляющих спонтанный мутагенез, не снижает митотического индекса, т.е. не угнетает деления клеток.

«Позитивные» факторы, способные вызвать подавление спонтанного мутагенеза, можно разделить на две группы. Первая группа связана с изменением настройки репарационных механизмов. Превращение повреждения ДНК в морфологически различимую хромосомную аномалию

опосредовано активностью механизмов склонной к ошибкам репарации. Поэтому снижение частоты aberrаций может быть связано с активацией безошибочной репарации. Вторая группа факторов связана со снижением уровня первичных повреждений ДНК. Способность продуктов одноэлектронного восстановления кислорода и перекисного окисления липидов индуцировать повреждения, ведущие к формированию хромосомных aberrаций, достаточно точно установлена (Marnett, 2000). Эти вещества постоянно генерируются митохондриями. Логично предположить, что исследованный препарат, подавляя фоновую генерацию митохондриальных АФК (Скулачев, 2009), снижает и содержание эндогенных соединений, повреждающих ДНК.

Обе исследованные дозы препарата вызывают статистически значимое снижение содержания 8-ОН-2-дезоксигуанозина в сыворотке (рис. 14). Отметим, что репарация окислительных повреждений ДНК связана с вырезанием 8-ОНdG. Поэтому, если бы SkQ1 работал как активатор репарации, мы получили бы эффект, обратный наблюдаемому.

Таким образом, можно предположить, что главным механизмом супрессии SkQ1 фонового уровня образования хромосомных aberrаций является снижение количества генотоксичных продуктов взаимодействия активных форм кислорода с биомолекулами.

Эксперименты по модификации SkQ1 индуцированного мутагенеза были проведены с целью поиска адаптогенных свойств этого препарата, не связанных непосредственно с геропротекторной активностью.

Гипербарическая оксигенация достаточно широко применяется в клинике. Все большее количество здоровых людей подвергается действию давления кислорода при глубоководных погружениях. При этом парциальное давление кислорода приближается к уровню терапевтических режимов ГБО. Мутагенный эффект такого воздействия описан в ряде работ (Гуськов, Шкурат, 1986; Guskov et al., 1990). Как показали результаты наших исследований, ионы Скулачева с антиоксидантной нагрузкой могут быть использованы для защиты от кислородного мутагенеза.

## **Заключение**

Таким образом, рассматривая аэробный метаболизм в целом, необходимо учитывать, что помимо основных функций, клеточные процессы и структуры несут определенную «антиоксидантную нагрузку». При этом эффективность неспецифических защитных механизмов достаточно велика.

Наши исследования показали наличие высокой антиоксидантной активности солей марганца, таких распространенных метаболитов, как аллантаин и аминокислоты; а также существование как минимум двух высокоэффективных неспецифических механизмов защиты от окислительного стресса. Замыкание ДНК в кольцо защищает молекулы от разрушения гидроксильным радикалом. Удаление избыточного кислорода

дыхательной системой митохондрий дрожжевых клеток защищает их от токсического действия кислорода под давлением.

Именно совокупность специфических и неспецифических антиоксидантов создает антиоксидантный потенциал организма, величина которого имеет важнейшее адаптивное значение. Результаты исследования неспецифических кислород-протекторных механизмов могут быть успешно внедрены в самых различных областях практической деятельности – от разработки эффективных систем мониторинга качества среды до создания высокоэффективных лекарственных препаратов и пищевых добавок.

## ВЫВОДЫ

1. Ионы марганца защищают ДНК от активных форм кислорода, генерируемых при разложении перекиси водорода *in vivo* и *in vitro*.
2. Аллантиин способен эффективно подавлять индукцию мутаций и SOS-ответа у *E.coli*, вызванную перекисью водорода.
3. Аминокислоты обладают супероксидустраняющей активностью. Максимальную активность проявляет лизин.
4. Кислород под давлением и генерация супероксид-аниона за счет аутоокисления гидроксиламина в щелочной среде не способны разрушать первичную структуру нуклеиновых кислот. Генерация супероксид-аниона в присутствии ионов меди вызывает разрушение структуры молекул нуклеиновых кислот. ДНК-тропный эффект возрастает в ряду: РНК, линейная ДНК, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК.
5. Маннит защищает ковалентно замкнутую кольцевую, но не линейную ДНК, от разрушения при генерации супероксид-аниона в присутствии ионов меди.
6. Дыхательные мутанты дрожжей чувствительны к дозам ГБО, подпороговым для дикого штамма.
7. Различную чувствительность  $\rho^-$  и  $\rho^+$  штаммов невозможно объяснить различиями по активности супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы – основных перехватчиков активных форм кислорода.
8. Экстракты тканей рыб подавляют вызванную перекисью водорода SOS-индукцию у *E.coli*. Препараты из осетровых рыб обладают большей активностью по сравнению с препаратами из костистых рыб.
9. Адресованное в митохондрии производное пластохинона – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфоний (SkQ1) в дозах 25 и 250 нмоль/кг защищает ДНК крыс от повреждения активными формами кислорода *in vivo*.
10. Помимо основных функций, некоторые клеточные процессы и молекулярные структуры образуют систему неспецифических механизмов защиты от кислорода, сформировавшихся на ранних этапах развития аэробной жизни. В связи с чем их исследование дает



возможность лучше представить этапы эволюции современных метаболических путей и клеточных структур.

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Чистяков В.А. Деградация нуклеиновых кислот в условиях генерации супероксид-аниона в присутствии ионов меди / Водолажский Д.И., Чистяков В.А., Гуськов Е.П., Шерстнев К.Б. // Молекулярная биология. 1987. Т. 21, №6. С. 1664–1670.
2. Чистяков В.А. Участие дыхательной системы дрожжей-сахаромицетов в защите от токсического действия кислорода / Чистяков В.А., Водолажский Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61, №9. С.1610 – 1614.
3. Чистяков В.А. Усиление токсического действия металлов аскорбиновой кислотой / Чистяков В.А., Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н., Войнова Н.В. // Экология. 2002. Т.33, №4. С. 331-333.
4. Чистяков В.А. Аллантаин как тушитель свободных радикалов / Гуськов Е.П., Клецкий М.Е., Корниенко И.В., Олехнович Л.П., Чистяков В.А., Шкурат Т.П., Прокофьев В.Н., Жданов Ю.А. // ДАН, серия Биохимия, Биофизика. 2002. Т.383, № 2. С.105-107.
5. Чистяков В.А. Интенсивность свободнорадикальных процессов в гомогенатах метаболически-активных тканей русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae) как показатель пригодности тканей для генетического коллекционирования / Черенкова И.Ф., Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Соколова И.В. // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43, №1. С. 142-144.
6. Чистяков В.А. Окислительный стресс – как один из основных механизмов токсического действия тяжелых металлов / Чистяков В.А. // Известия вузов. Естественные науки. Северо-Кавказский регион. Приложение 2003. №7. С. 65-69.
7. Чистяков В.А. Биохимические механизмы кислородного мутагенеза у микроорганизмов / Чистяков В.А. // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Приложение. 2003.- №11. С. 57–63.
8. Чистяков В.А. Хрящевая ткань как источник биологически активных веществ / Чистяков В.А. // Вопросы рыболовства. 2004. Т. 17, №1.С. 174–178.
9. Чистяков В.А. Аллантаин как витамин / Гуськов Е.П., Прокофьев В.Н., Клецкий М.Е., Корниенко И.В., Гапуренко О. А., Олехнович Л.П., Чистяков В.А., Шестопалов А.В., Сазыкина М.А., Маркеев А.В., Шкурат Т.П., Малхосян С.Р., Жданов Ю.А. // ДАН, серия Биохимия, Биофизика. 2004. Т.398, № 6. С.823-827.
10. Чистяков В.А. Супероксидустраняющая активность некоторых аминокислот в водных растворах / Чистяков В.А., Корниенко И.В., Клецкий М.Е., Корниенко И.Е., Лисицын А.С. Новиков В.В. // Биофизика. 2005. Т. 50, №4. С. 601-605.

11. Чистяков В.А. Неспецифические механизмы защиты от деструктивного действия активных форм кислорода / Чистяков В.А. // Успехи современной биологии. 2008. ВЫП. 128, № 3. С. 301–308.
12. Чистяков В.А. Роль аллантаина в процессах репродукции / Шкурят Т.П., Ломтева С.В., Александрова А.А., Азарин К.В., Чистяков В.А. // Валеология. 2008. № 4. С. 32–37.
13. Чистяков В.А. Антиоксидантный потенциал некоторых природных азотсодержащих соединений / Чистяков В.А., Азарин К.В., Усатов А.В. // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2008. №5. С. 75–77.
14. Чистяков В.А. Неферментативные механизмы контроля уровня активных форм кислорода / Азарин К.В., Чистяков В.А., Усатов А.В. // Валеология. 2008. №3. С. 68–74.
15. Чистяков В.А. Супероксидустраниющая активность природных азотсодержащих соединений / Азарин К.В., Чистяков В.А., Усатов А.В. // Валеология. 2008. №2. С. 38–43.
16. Чистяков В.А. Аллантаин и урат как супрессоры генотоксического эффекта ультрафиолетового излучения длиной волны 300 – 400 нм / Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Коленко М.А., Азарин К.В. // Экологическая генетика. 2009. Т. 7, № 2. С. 44–46.
17. Чистяков В.А. Реликтовые формы как источник эффективных смесей антиоксидантов / Чистяков В.А., Сазыкина М.А. // Валеология. 2009. №2. С. 59–63.
18. Чистяков В.А. Возрастная потеря клеточности: исследование *in silico* / Чистяков В.А., Денисенко Ю.В. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2009. Т. 53, №3. С. 105–110 .
19. Чистяков В.А. Антимутагенная активность производного пластохинона, адресованного в митохондрии / Чистяков В.А., Сазыкина М.А., Александрова А.А., Беличенко Н.И., Машкина Е.В., Гутникова Л.В., Золотухин П.В., Шкурят Т.П. // Биохимия. 2010. Т. 75, № 3. С. 331–336.

#### **Авторские свидетельства и патенты**

20. Чистяков В.А. Способ определения супероксидустраниющей активности / Чистяков В.А., Голубев Г.А., Лисицин А.С. // Авторское свидетельство №1793375. Зарегистрировано 8.10.1992.
21. Чистяков В.А. Способ определения генотоксичности химических веществ / Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Войнова Н.В. // Патент РФ № 2179581. 2001.
22. Чистяков В.А. Способ хранения ДНК / Чистяков В.А., Мирзоян А.В., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Азарин К.В. // Патент на изобретение № RU 2352636 С1. 2007.

23. Чистяков В.А. Способ иммобилизации образцов ДНК / Чистяков В.А., Мирзоян А.В., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Мухоньков М.М., Барминцев В.А. // Патент на изобретение RU 2346984 С2. 2008.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации:  
Монографии и глава в коллективной монографии.**

24. Чистяков В.А. Новые технологии в рыбохозяйственных исследованиях / Войнова Н.В., Чистяков В.А., Корниенко И. В., Барминцев В.А. // Ростов-на-Дону: Эверест. 2001. 112 с.
25. Чистяков В.А. Генотоксичность и антимуtagenная активность в тканях осетровых рыб Азовского моря / Чистяков В.А., Дудкин С.И., Сазыкина М.А., Тимошкина Н.Н. // Среда, биота и моделирование экологических процессов в Азовском море / под ред. Матишова Г.Г. Аппатиты: изд-во Кольского научного центра РАН. 2001. С. 218-226.
26. Чистяков В.А. Биохимические механизмы неспецифической защиты клетки от окислительного стресса / Чистяков В.А., Сазыкина М.А. // Ростов-на-Дону: Издательство ЮФУ. 2009. 158 с.

**Статьи и тезисы**

27. Чистяков В.А. Коррекция артефактов SOS-lux теста, связанных с подавлением активности люциферазы / Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Птицын Л.Р. // Тез. докл. 2-ого съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Т. 2 С-Пб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ. 2000. С. 170-171.
28. Чистяков В.А. Осетровые рыбы как потенциальный источник биологически активных веществ / Чистяков В.А., Сазыкина М.А., Гартунг В.В., Дудкин С.И. // Тезисы докл. науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России». Краснодар: «Здравствуйте». 2001. С. 304–305.
29. Чистяков В.А. Проблемы методологии мониторинга токсичности природных сред: необходимость синтеза. Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие регионов Юга России / Воинова Н.В., Чистяков В.А., Федоренко Г.М., Сазыкина М.А. // Материалы Международной конференции, 3-5 октября 2007. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет». 2007. С. 16 – 20.
30. Chistyakov V.A. Manganese ions enhance resistance of DNA to reactive oxygen species / Chistyakov V.A., Rynza E.T., Sazykina M.A., Mirzoyan A.V. // «Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability. June 24-26, 2008. St. Petersburg, Russia»: изд-во «Арта», 2008. P.59.
31. Чистяков В.А. Антиоксиданты – супрессоры генотоксичности ультрафиолетовой компоненты солнечного света / Чистяков В.А.,

Сазыкина М.А., Коленко М.А., Червяков Г.Г., Усатов А.В. // Тез. докл. Международного Междисциплинарного Симпозиума. Судак - Крым, Украина, 19-30 сентября 2008 г. «От экспериментальной медицины к превентивной и интегративной медицине» / Под ред. Тимофеева И.В., Перминовой Н.Г. 2008 г. С. 134.

32. Чистяков В.А. Митохондриально-направленные антиоксиданты (производные «ионов Скулачева») подавляют мутагенез и увеличивают уровень эстрадиола / Чистяков В.А. // Тез. докл. Международной конференции «Биоэнергетика в прошлом, настоящем и будущем: путь к "Homo sapiens liberatus"» 22–24 февраля 2010. Москва. С. 27.
33. Чистяков В.А. Генопротекторный эффект аллантаина и урата при действии свободных радикалов / Азарин К.В., Чистяков В.А., Усатов А.В. // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010. Москва. С. 3–4.

### Перечень использованных сокращений

**АФК** – активные формы кислорода

**ГБО** – гипербарическая оксигенация

**СОД** – супероксиддисмутаза

**СУА** – супероксидустраняющая активность

**ТБК** – тиобарбитуровая кислота

**ПОЛ** – перекисное окисление липидов

**SkQ1**– 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфоний