

УДК 577.1:577.3:547.9

©Сирота

УЧАСТИЕ КАРБОНАТ/БИКАРБОНАТНЫХ ИОНОВ В СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩЕЙ РЕАКЦИИ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

Т.В. Сирота

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
142290, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3; тел.: +7(4967)739170;
эл. почта: sirotatv@rambler.ru

В супероксидгенерирующей реакции автоокисления адреналина, протекающей в щелочном буфере, которая моделирует процесс хиноидного окисления адреналина в организме, была выявлена существенная роль карбонат/бикарбонатных ионов и сделано предположение об их непосредственном участии в процессе образования не только супероксид анион радикалов ($O_2^{\cdot-}$), но и, возможно, других радикалов, производимых из карбонат/бикарбонатного буфера. Используя буферы разного состава, показано, что скорость накопления адrenoхрома, конечного продукта окисления адреналина, и скорость образования $O_2^{\cdot-}$ зависят от концентрации в буфере карбонат/бикарбонатных ионов и что эти ионы существенно ускоряют процесс автоокисления адреналина, проявляя прооксидантные свойства. Поскольку определяется значительно большее по сравнению с адrenoхромом количество диформаза, продукта восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), идентифицирующего, согласно данным литературы, $O_2^{\cdot-}$, сделано предположение: в процессе автоокисления адреналина происходит одноэлектронное восстановление не только растворенного в буфере кислорода, приводящее к образованию супероксида, но и, возможно, растворенного диоксида углерода, а также компонентов карбонат/бикарбонатного буфера с образованием соответствующих радикалов. Представленные графики исследования зависимости степени ингибирования процесса образования адrenoхрома и диформаза от концентрации супероксиддисмутазы (СОД), показали, что, действительно, в реакции автоокисления адреналина образуются не только супероксидные радикалы.

Поскольку в живой природе карбонат/бикарбонатные ионы присутствуют повсеместно, обсуждается их участие в свободно-радикальных процессах, происходящих в организме.

Ключевые слова: адреналин, супероксид, кислород, нитросиний тетразолий, адrenoхром, супероксиддисмутаза, карбонат/бикарбонатные ионы, диоксид углерода, карбонатные радикалы, радикалы диоксид углерода.

ВВЕДЕНИЕ

Один из путей превращения адреналина, гормона-медиатора симпато-адреналовой системы организма – хиноидное окисление. Доля адреналина, окисляющегося этим путём не велика, в основном, как известно, он утилизируется путём оксиметилирования с образованием метанефрина и через окислительное дезаминирование с участием моноаминоксидазы [1-3]. Специфические ферменты хиноидного окисления адреналина не выявлены, но образующиеся продукты реакции существуют, и известны ферменты,

их утилизирующие [2-6]. Удаление продуктов хиноидного окисления адреналина и других аминохромов происходит с участием ферментов глутатион-S-трансферазы [2, 3] и хинонредуктаз [4]. Хиноидное окисление адреналина относят к аномальному метаболизму катехоламинов, с которым в настоящее время связывают его нейро- и кардиотоксическое действие. Причина токсичности, как предполагается, обусловлена не только накоплением продуктов окисления катехоламинов аминохромов, но и образующимися в этом процессе активными формами кислорода (АФК), а именно, как считается, супероксид анионами ($O_2^{\cdot-}$) [4, 7-9].

В работе Munoz et al. [10] детально представлен химизм процесса хиноидного окисления катехоламина дофамина, объясняющий возможный молекулярный механизм развития болезни Паркинсона. Таким же образом происходит и патофизиологическое окисление адреналина [1-3].

Интерес к этой теме обусловлен также и тем, что продукты окисления адреналина, белки-хиноны (quinoproteins), глутатионовые конъюгаты адреналина и адrenoхрома (GSH adduct) оказывают влияние на редокс состояние клетки и ткани [8, 11-13]. Такое их действие обусловлено, вероятно, участием в митохондриальных процессах [13, 14], в регуляции NO-зависимой гуанидинциклазы [15], регуляции функционирования тиреоидных гормонов [16].

Моделью хиноидного окисления адреналина является реакция автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере, предложенная Misra и Fridovich для определения активности фермента супероксиддисмутазы (СОД) [17]. СОД, перехватывая $O_2^{\cdot-}$, тормозит накопление адrenoхрома. Процесс автоокисления адреналина происходит по типу цепной реакции и начинается после внесения адреналина в щелочной раствор. При низкой концентрации H^+ самоиницируется процесс внутримолекулярных перестроек молекулы адреналина: происходит депротонизация, последующая циклизация и образование соединения хиноидной природы – адrenoхрома. В буферный раствор поступают высвобождающиеся электроны, которые получает растворённый в среде инкубации кислород. Происходит одноэлектронное восстановление кислорода и образуются супероксид анионы. Последовательность реакций автоокисления адреналина, в результате которых образуется адrenoхром и $O_2^{\cdot-}$, детально описана в литературе [18-21] и в наших предыдущих работах [22, 23].

Ранее было отмечено, что интенсивность реакции автоокисления адреналина существенно зависит не только от подобранных стандартизированных условий проведения реакции, таких как температура, количество добавляемого адреналина, рН буфера, но и от состава буфера [24, 25]. Однако, вопрос о том, как и почему состав буфера влияет на автоокисление адреналина, ранее не изучался.

Цель настоящей работы – исследовать роль и возможный механизм участия карбонат/бикарбонатных ионов в супероксид-генерирующей реакции автоокисления адреналина.

Проведённые исследования показали, что в развитии реакции существенная роль принадлежит именно этим ионам,

которые являются основными компонентами используемого буфера. Представленные результаты впервые позволили предположить, что в данной модельной системе образуются не только, как считается, $O_2^{\cdot-}$, но и другие радикалы, а именно, производные семейства CO_2 /карбонат/бикарбонатных ионов. Поскольку карбонат/бикарбонатные буферные системы широко распространены в природе наряду с постоянно протекающими окислительно-восстановительными реакциями, то, вероятно, образование радикалов из этого буфера процесс неизбежный и эти ионы могут принимать непосредственное участие в свободно-радикальных реакциях как акцепторы и затем доноры электронов.

МЕТОДИКА

Спектральные исследования автоокисления адреналина проводили в разных буферах: 0,2 М карбонатный буфер, рН 10,5; калий-фосфатный буфер (0,15 М KCl и 20 мМ KH_2PO_4), рН 8,5 и он же с рН 9,7, доведённым сухим трисом ((гидроксиметил)аминометан); PBS-буфер, рН устанавливали добавлением 0,2 М карбонатного буфера до 9,7 и 10,2. В работе также использовали CAPS буфер, (3-[cyclohexylamino]-1-propane-sulfonic acid, “SigmaUltra”, США), необходимую величину рН которого, 10,5 и 11,0, устанавливали добавлением концентрированного раствора КОН. Этот реактив применяется для приготовления щелочных буферных растворов в диапазоне рН 9,7-11,1. Величина pK_a составляет 10,4 при 25°C. Также использовали буферы 0,2 М глицин-NaOH и 0,2 М глицин- Na_2CO_3 , рН 10,2 и 10,5, которые готовили, как описано в справочнике [26]. 0,2 М карбонатный буфер готовили из Na_2CO_3 , рН до необходимой величины устанавливали добавлением к раствору сухого $NaHCO_3$.

Измерения проводили в термостатированной кювете при температуре 22°C на спектрофотометре UV/VIS Uvikon-923 (Италия) в режиме “time Driver” при 347 нм (регистрировали образование адrenoхрома) или 560 нм (регистрировали образование диформаза, продукта восстановления нитросинего тетразолия (НСТ)) как описано ранее [22-24]. Применение НСТ, известного в литературе специфического реагента для идентификации супероксидных анионов, в реакции автоокисления адреналина было предложено нами ранее и этот подход подробно описан в работе [23].

Регистрацию реакции автоокисления адреналина начинали с момента внесения 0,23 мМ адреналина гидрохлорида в буфер при постоянном его перемешивании. В опытах

с НСТ его в концентрации 0,05-0,1 мМ добавляли в кювету до адреналина. Спектр поглощения синего окрашенного продукта восстановления НСТ показал наличие максимума поглощения в области 560 нм, что соответствует, по литературным данным, диформазау [27].

Скорость реакции образования адrenoхрома или диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле: $\Delta E/\Delta t = (E_t - E_1)/\Delta t$, где E_1 – регистрируемая оптическая плотность при длине волны 347 нм или 560 нм сразу же после внесения адреналина, E_t – оптическая плотность через время Δt , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина (в данных условиях – 3, 4 или 5 мин).

В работе использовали реактивы: 0,1% раствор адреналина гидрохлорида (фармакопейная форма); Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий, CAPS, трис, супероксиддисмутаза (“Sigma”, США); NaHCO_3 (“J.T. Baker”, Голландия); KCl, KH_2PO_4 , КОН, NaOH, глицин (“Lachema-Chemapol”, Словакия, Чехия). Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel): определяли среднее значение (M), стандартное отклонение ($s.d.$).

Представленные данные являются средними значениями, полученными в независимых экспериментах при 3-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было отмечено, что скорость реакции автоокисления адреналина существенно зависит не только от pH, что очевидно, так как именно в щелочной среде происходят внутримолекулярные перестройки молекулы адреналина, в результате которых адреналин окисляется до адrenoхрома и образуются супероксид анионы, но и от состава буфера [24, 25]. Было обнаружено, что в 0,2 М глицин-NaOH буфере в исследованном диапазоне pH (10,2-10,65) автоокисление адреналина происходит значительно медленнее, чем в 0,2 М карбонатном буфере [24]. Низкие скорости реакции наблюдались и при использовании 0,2 М боратного буфера в этом же диапазоне pH. Также было установлено, что в CAPS-буфере, в сравнение с карбонатным буфером, при одинаковом значении pH равном 10,4, скорость автоокисления адреналина была значительно ниже [25]. В этих опытах измеряли только образование адrenoхрома, конечного продукта

окисления адреналина. На основании анализа этих результатов [24, 25] и данных последующих исследований, работая уже с НСТ [23], где измерялась кинетика образования супероксида, возникал вопрос, требующий разрешения: почему состав буфера влияет на автоокисление адреналина. Имеющиеся данные показывали, что именно карбонат/бикарбонатные ионы важны и необходимы для развития реакции автоокисления адреналина.

Представленные на рисунке 1А результаты демонстрируют влияние карбонат/бикарбонатных ионов на этот процесс: последовательное разведение 0,2 М карбонатного буфера, pH 10,5, приводит к существенному снижению скорости реакции. Поскольку скорость реакции зависит от pH, в разведенных буферных растворах была измерена эта величина. На рисунке 1Б показано, что pH разведенных буферов в диапазоне от 0,2 М до 0,025 М не изменяется и только при концентрации 0,0125 М и 0,00625 М pH достоверно ($p=0,006$ и $p=0,002$, соответственно, относительно величины pH 0,025 М буфера) снижается. Понижение pH в 0,0125 М и 0,00625 М карбонатных буферах, естественно, вносит свой вклад в уменьшение скорости автоокисления адреналина, однако в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,025 М не наблюдается изменений pH и низкая скорости реакции обусловлена исключительно только уменьшением концентрации карбонат/бикарбонатных ионов.

В опытах с CAPS-КОН буферами этот вывод также подтверждается. Используя эти буферы, была исследована кинетика не только накопления адrenoхрома, продукта окисления адреналина, регистрируемая при 347 нм (рис. 2А), но и образование супероксидных радикалов, идентифицируемых и регистрируемых с помощью НСТ при 560 нм (рис. 2Б). На рисунке 2А, кривая 1, показано, что в 0,2 М CAPS-КОН буфере, pH 10,5, накопление адrenoхрома происходит значительно медленнее, чем в 0,2 М карбонатном буфере (кривая 2), то есть присутствие карбонат/бикарбонатных ионов при одинаковом значении pH существенно активизирует накопление адrenoхрома. Рисунок 2Б иллюстрирует: скорость образования диформаза, продукта восстановления НСТ, также существенно выше в присутствии карбонат/бикарбонатных ионов (кривая 3). В CAPS-КОН буфере при pH 10,5 (кривая 1) и даже при pH 11,0 (кривая 2) реакция протекает значительно медленнее. Следует отметить, что количество образующихся $\text{O}_2^{\bullet-}$, измеренное с помощью НСТ, существенно больше, чем адrenoхрома: следует обратить внимание на размерность шкалы ординат (y) (рис. 2А,Б).

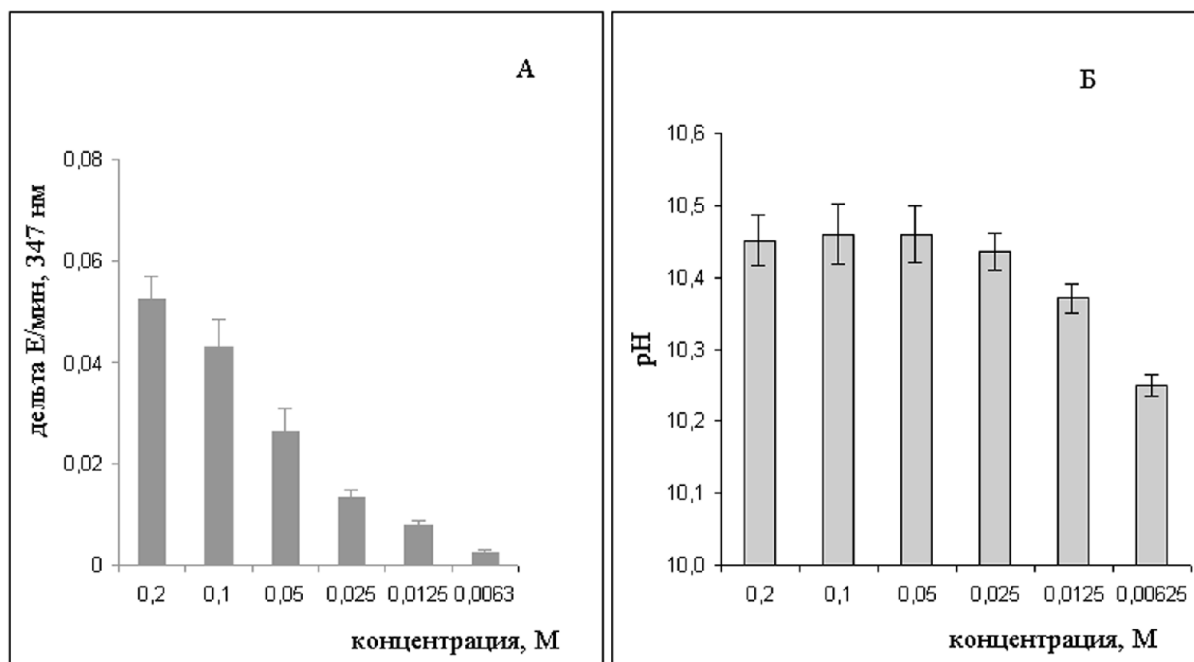


Рисунок 1. Скорость образования адrenoхрома в реакции автоокисления адреналина в буферах с разной концентрацией карбонатных ионов, получаемых путём последовательного разведения 0,2 М карбонатного буфера (А), и значение pH в этих буферных растворах (Б). Измерения образования адrenoхрома проводили при 347 нм в присутствии 0,23 мМ адреналина при температура 22°C. Расчёт скорости реакции описан в разделе “Методика”.

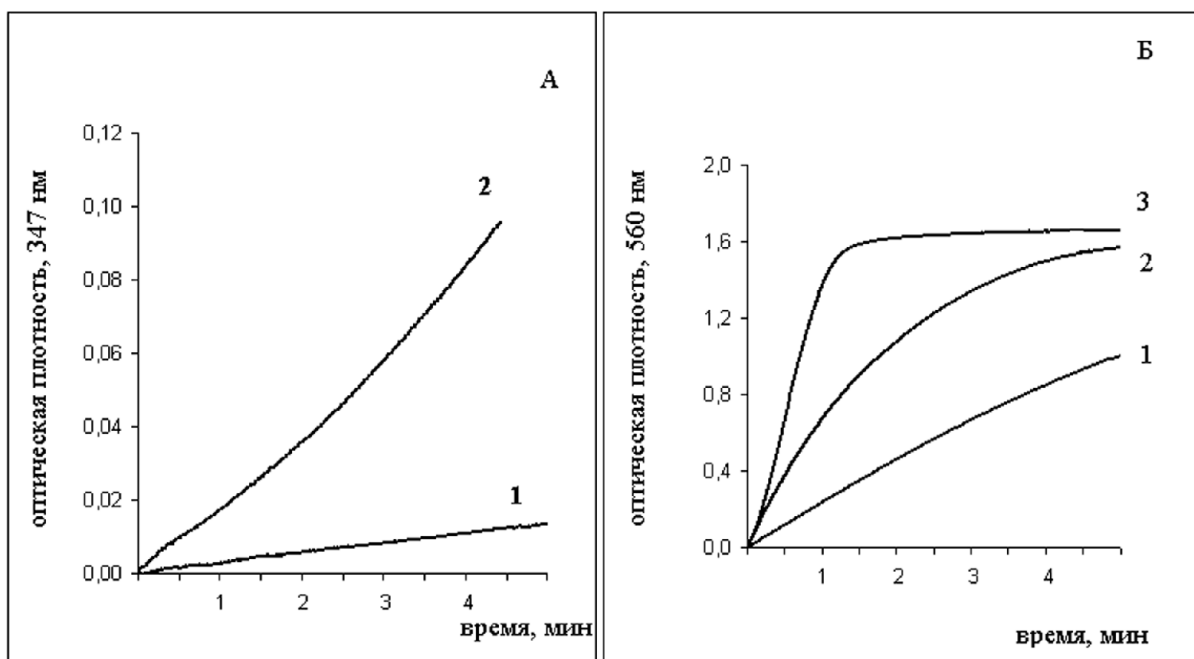


Рисунок 2. Кинетика образования адrenoхрома, регистрация при 347 нм (А), и супероксид анионов (Б), регистрация при 560 нм, в присутствии 0,1 мМ НСТ в разных по составу буферах с одинаковой величиной pH: А: 1 - 0,2 М CAPS-КОН буфер, pH 10,5; 2 - 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,5; Б: 1 - 0,2 М CAPS-КОН буфер, pH 10,5; 2 - 0,2 М CAPS-КОН буфер, pH 11,0; 3 - 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,5. Условия проведения реакции как на рисунке 1.

Данные на рисунке 3 также показывают, что и при низких значениях pH внесение карбонат/бикарбонатных ионов активирует

процесс образования $O_2^{\bullet-}$ в исследуемой модели. Известно, что при pH ниже 8,5 автоокисление адреналина практически не происходит [17],

это и демонстрирует кривая 1 на рисунке 3. После доведения pH до 9,7 добавкой сухого триса реакция незначительно, но начинает развиваться (кривая 2), а введение в среду карбонат/бикарбонатных ионов (добавка 0,2 М карбонатного буфера) при том же низком значении pH (pH 9,7) активирует реакцию (кривая 3). Кривая 4 на рисунке 3, показывает, как активно происходит образование диформаза при повышении pH до 10,2 и в присутствии карбонат/бикарбонатных ионов. Прооксидантное действие карбонат/бикарбонатных ионов также иллюстрируется на рисунках 4А (регистрация адренохрома, 347 нм) и 4Б (регистрация диформаза, 560 нм) при использовании 0,2 М глициновых буферов, pH которых до величины 10,2 и 10,5 довели NaOH (0,2 М глицин-NaOH буфер) или Na₂CO₃ (0,2 М глицин-Na₂CO₃ буфер), соответственно. Введение в буфер карбонатных ионов активирует реакцию даже сильнее, чем увеличение pH от 10,2 до 10,5 (сравнить на рис. 4А кривые 1 и 3), а при pH 10,5 добавка карбонатных ионов ещё более ускоряет окисление адреналина и образование O₂^{•-} (сравнить на рисунке 4А кривые 2 и 4, а также на рисунке 4Б кривые 1 и 2).

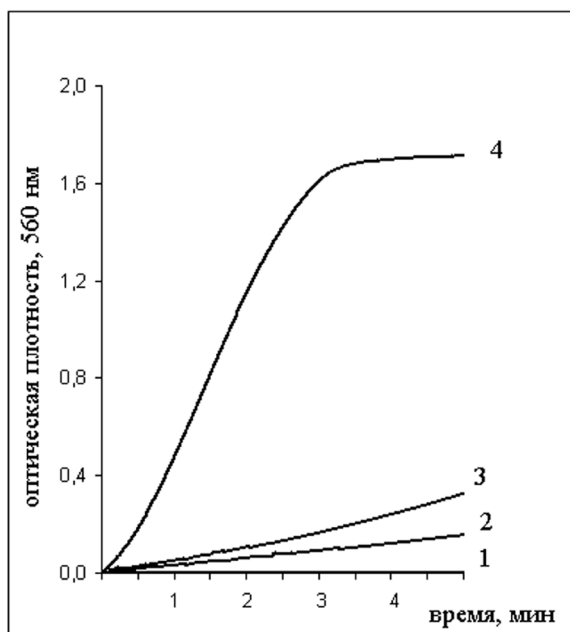


Рисунок 3. Активация образования супероксид анионов в присутствии карбонат/бикарбонатных ионов при разных значениях pH: 1- 0,15 М KCl и 20 мМ KH₂PO₄ буфер, pH 8,5; 2 - 0,15 М KCl и 20 мМ KH₂PO₄ буфер, добавка триса до pH 9,7; 3 - PBS-буфер добавка 0,2 М карбонатного буфера до pH 9,7; 4 - PBS-буфер добавка 0,2 М карбонатного буфера до pH 10,2. Условия проведения реакции как на рисунке 1.

Как отмечалось выше, на представленных рисунках при регистрации адренохрома и диформаза размерность шкалы ординат (y) существенно различается, что указывает на несоизмеримо большее количество образующегося диформаза по сравнению с адренохромом. Следует отметить, что коэффициенты молярной экстинкции (ϵ) адренохрома и диформаза соизмеримы: адренохром – $\epsilon = 2,28 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ при 310 нм [20, 23]; диформазан – $\epsilon = 2,78 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ при 560 нм [28, 23]. Таким образом, количество образующегося диформаза приблизительно в 80 раз больше, чем адренохрома. Известно, что реакция автоокисления адреналина – это цепная реакция, поэтому стехиометрию не следует рассчитывать как линейный процесс.

Полученные результаты – активация реакции автоокисления адреналина в присутствии карбонат/бикарбонатных ионов и образование значительного количества диформаза – позволили предположить, что в процессе автоокисления адреналина происходит не только одноэлектронное восстановление кислорода, растворенного в буфере, с образованием O₂^{•-}, но и одноэлектронное восстановление других компонентов буфера с образованием продуктов радикальной природы. Вероятными претендентами могут быть растворенный в буфере диоксид углерода и карбонат/бикарбонатные ионы.

Результаты экспериментов с СОД, представленные на рисунке 5, подтверждают наше предположение. Показано, что в исследуемой системе при регистрации адренохрома максимально ингибирующее действие СОД составляет только около 90% и не удаётся добиться полного ингибирования реакции (рис. 5, кривая 1). Это указывает на то, что около 10% высвобождающихся электронов “уходят” не на образование супероксида, а, возможно, на образование других радикалов. Регистрируя образование диформаза в присутствии различных концентраций СОД, также обнаружено, что фермент ингибирует процесс всего лишь не более чем на 50% (рис. 5, кривая 2), то есть именно такое количество высвобождающихся электронов “уходит” на образование O₂^{•-}. Следует отметить, что условия проведения реакции в присутствии НСТ несколько иные, чем при измерении адренохрома: снижена величина pH и уменьшена концентрация добавляемого адреналина (см. подпись к рис. 5). Это необходимо было сделать, чтобы скорость реакции образования диформаза была соизмерима со скоростью накопления адренохрома, иначе ингибирующее

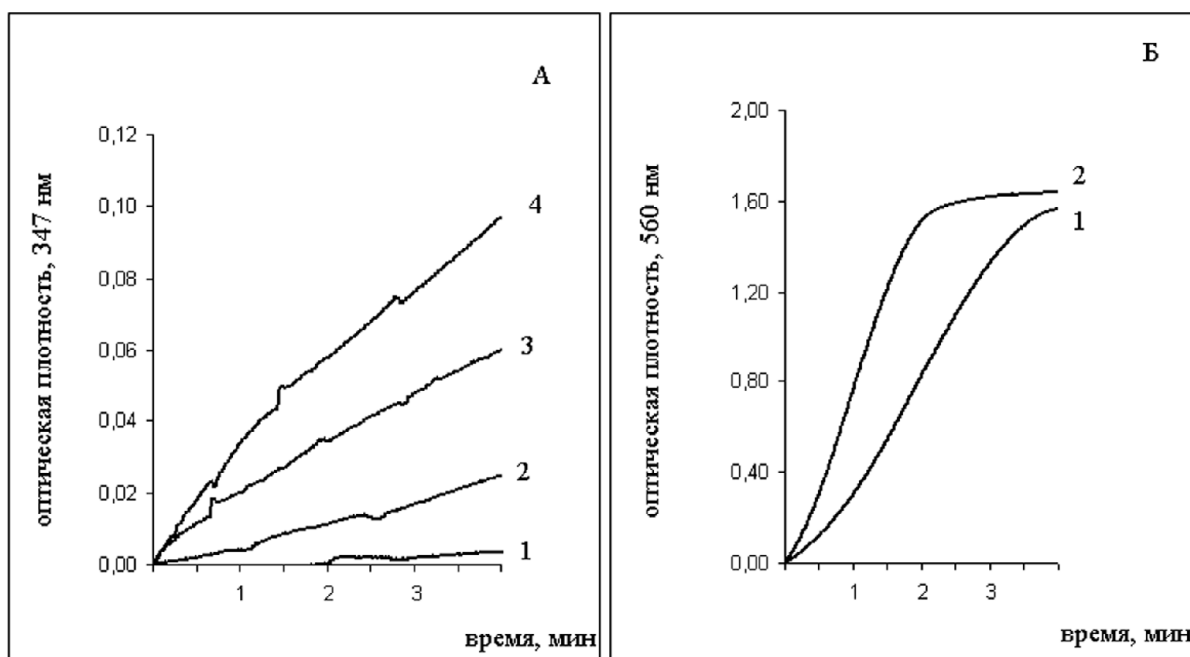


Рисунок 4. Прооксидантное действие карбонат/бикарбонатных ионов. Влияние присутствия карбонат/бикарбонатных ионов на образование адренохрома (А, регистрация 347 нм) и НСТ-детектируемых анионов (Б, регистрация 560 нм в присутствии 0,05 мМ НСТ) в 0,2 М глицин- NaOH или 0,2 М глицин- Na_2CO_3 буферах, pH 10,2 и 10,5. А: 1 - pH 10,2, без Na_2CO_3 ; 2 - pH 10,5, без Na_2CO_3 ; 3 - pH 10,2, + Na_2CO_3 ; 4 - pH 10,5, + Na_2CO_3 ; Б: 1 - pH 10,2, без Na_2CO_3 ; 2 - pH 10,2, + Na_2CO_3 . Условия проведения реакции как на рисунке 1.

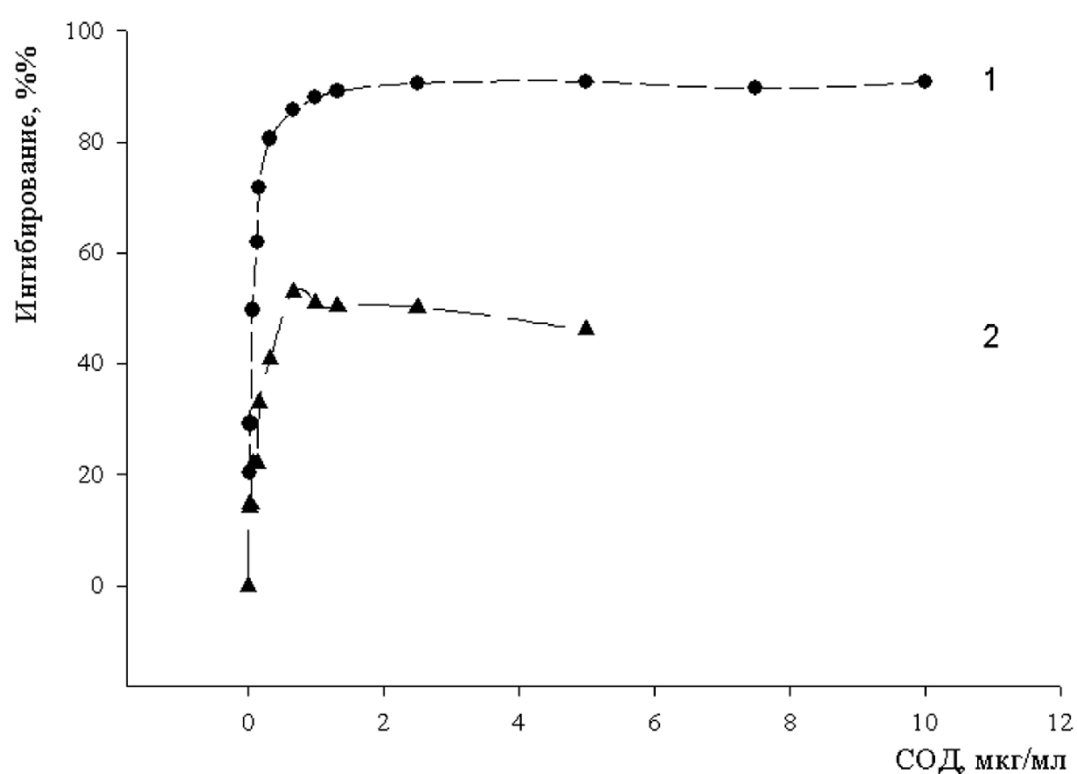


Рисунок 5. Действие разных концентраций СОД на образование адренохрома (кривая 1) и диформаза (кривая 2). Образование адренохрома регистрировали при 347 нм в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,5 в присутствии 0,23 мМ адреналина; образование диформаза регистрировали при 560 нм в 0,2 М карбонатном буфере, pH 9,7, в присутствии 0,025 мМ НСТ и 0,0575 мМ адреналина. Условия проведения реакции как на рисунке 1. Температура в кювете 25°C.

действия СОД было трудно достичь, если даже использовать достаточно высокие концентрации СОД. В этих подобранных условиях показано (рис. 5, кривая 2), что только 50% высвобождающихся электронов поступают на образование супероксид радикалов, остальные или, вероятно, на прямое непосредственное восстановление НСТ, или на образование других радикалов. На возможность прямого восстановления НСТ в супероксидгенерирующей системе указано в работе Beauchamp и Fridovich, которые, исследуя супероксидгенерирующую реакцию ксантин/ксантиноксидаза, не могли достичь её полного ингибирования ферментом СОД и пришли к выводу, что в аэробных условиях в этой ферментативной реакции имеет место прямое восстановление НСТ [29]. Вероятно, в этих экспериментах [29] и в наших опытах (рис. 2-4) происходит и прямое восстановление НСТ и образование супероксид анионов (опыты с СОД это подтверждают), но и не исключается образование других радикалов. Возможно, что и в опытах Beauchamp и Fridovich также происходит образование радикалов из карбонат/бикарбонатного буфера и диоксида углерода, поскольку в работе использовался карбонатный буфер, pH 10,2 [29].

В настоящем исследовании показана существенная роль карбонат/бикарбонатных ионов в развитии реакция автоокисления адреналина, а именно их активирующее действие. Можно предположить, что эти ионы непосредственно сами могут принимать электроны и, таким образом, участвовать в реакции. То есть конечные продукты реакции автоокисления адреналина, кроме адренохрома, могут быть не только супероксид анионы, но и радикалы карбонат/бикарбонатного буфера и диоксида углерода, растворённого в буфере. Такое наше предположение основывается на данных современной литературы, где активно обсуждается существование и роль карбонатных радикалов и радикалов диоксида углерода [30-38, 42].

Изучая молекулярный механизм пероксидазного действия Cu-Zn-СОД, было показано, что важным и необходимым участником реакции является бикарбонатный ион (HCO_3^-), который, взаимодействуя с пероксидом водорода, образует промежуточный интермедиат пероксимонокарбонат (HOOCO_2^-), формирующий затем карбонат анион радикал ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) [30-35]. В условиях исследуемой нами реакции автоокисления адреналина присутствуют следующие компоненты: буфер $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$, растворённые в буфере атмосферные O_2 и CO_2

и вносится адреналин; в процессе его окисления высвобождаются электроны. Эти электроны поступают на кислород с образованием супероксид радикалов, которые могут спонтанно дисмутировать с образованием пероксида водорода, присутствие которого нами было установлено в полярографических экспериментах с использованием каталазы [22]. Таким образом, в реакционной среде, где происходит автоокисление адреналина, кроме названных выше соединений, есть и образовавшийся пероксид водорода. Спонтанное взаимодействие пероксида водорода и бикарбонатных ионов, как описано в работах [30-35], может приводить к образованию промежуточного продукта пероксимонокарбоната, из которого и возникает затем карбонатный анион радикал. Экспериментальные доказательства такого хода событий представлены в работе [34]. В этом направлении также ведутся исследования, описанные в работах [30-33, 35]. Такая логика событий приемлема и для реакции автоокисления адреналина, что позволяет предположить возможность образования карбонатных радикалов в этой реакции.

В известной ферментативной модельной системе ксантин/ксантиноксидаза также генерируются не только супероксид анион радикалы, пероксид водорода и пероксинитрит, но и продуцируются карбонатные анион радикалы, которые, как предполагается, могут быть важными медиаторами в патофизиологических эффектах ксантиноксидазы [36]. В литературе демонстрируются и обсуждаются возможные пути образования при различных условиях пероксимонокарбоната и карбонатных радикалов как патогенетических оксидантов из вездесущего физиологического буфера карбонат/бикарбонат/диоксид углерода [33, 37].

Существенная роль отводится и диоксиду углерода в реакциях с участием АФК. В некоторых работах его роль считается более важной, чем бикарбонатных ионов [38]. Необходимо отметить, что растворимость диоксида углерода в воде больше, чем кислорода и других газов атмосферы, диффузно растворяемых в водных средах [39-41]. Считается, что растворимость CO_2 в 70 раз выше, чем O_2 и в 150 раз, чем N_2 . Учитывая это, можно полагать, что диоксид углерода, находясь в водно-буферных средах, подобно кислороду, также принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях.

Интересные "взаимоотношения" в карбонат/бикарбонатных водных системах описаны в исследованиях Воейкова и соавт., где цитируются работы о возможности

одноэлектронного восстановления диоксида углерода с образованием анион радикала $\text{CO}_2^{\cdot-}$ [42]. Также показано, что даже в обычных условиях в водных растворах бикарбонатов постоянно продуцируются супероксид радикалы и другие АФК и особую роль играют карбонат/бикарбонатные ионы. Сигнал тайрона, специфического ЭПР-зонда на супероксид анионы, не обнаруживается, если в исследуемой системе pH доведён с помощью NaOH и отсутствуют бикарбонатные ионы. Показано также, что амплитуда сигнала ЭПР тайрона возрастает с ростом концентрации $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. Процесс может происходить, как считают авторы, при наличии доноров электронов, например HO^\bullet , одного из продукта одноэлектронного окисления воды, который может окислять бикарбонатный анион (HCO_3^-) до карбонатного анион радикала $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [42].

В исследуемой нами реакции автоокисление адреналина, в результате преобразования адреналина, происходит активная “поставка” в водно-карбонатную среду электронов, которые, очевидно, “потребляются” как кислородом, так и другими компонентами буфера.

Представленные в настоящем исследовании результаты и анализ литературы впервые позволили предположить, что в используемой нами модельной системе реакции автоокисления адреналина, а это возможно и в организме, образуются не только супероксид анионы, но и карбонатные радикалы, и радикалы

диоксида углерода. Уникальная биологическая активность карбонат/бикарбонатных ионов, несомненно, связана с такой их способностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящем исследовании результаты, с учётом литературных данных, позволили обобщить и представить в виде нижеследующей схемы возможные этапы образования АФК в процессе автоокисления адреналина (рис. 6). Окисляющийся до адренохрома адреналин и его последующие промежуточные продукты – доноры электронов (1). Высвобождающиеся электроны могут поступать не только на растворенный в буфере кислород, образуя супероксидные анион радикалы (2), но и на другие компоненты используемого буфера, а именно – растворенный в буфере атмосферный диоксид углерода, что приводит к образованию радикала диоксида углерода (3а). При взаимодействии бикарбонатных ионов буфера и пероксида водорода, продукта спонтанной дисмутации супероксида, могут образовываться карбонатные радикалы (3б) [34]. Карбонат-ион радикал также может образовываться из бикарбонатных ионов при участии гидроксил-радикала (HO^\bullet), продукта одноэлектронного окисления воды (3в) [42].

Поскольку в живой природе карбонат/бикарбонатные ионы присутствуют повсеместно, нельзя не исключить их участия как акцепторов и затем доноров электронов.

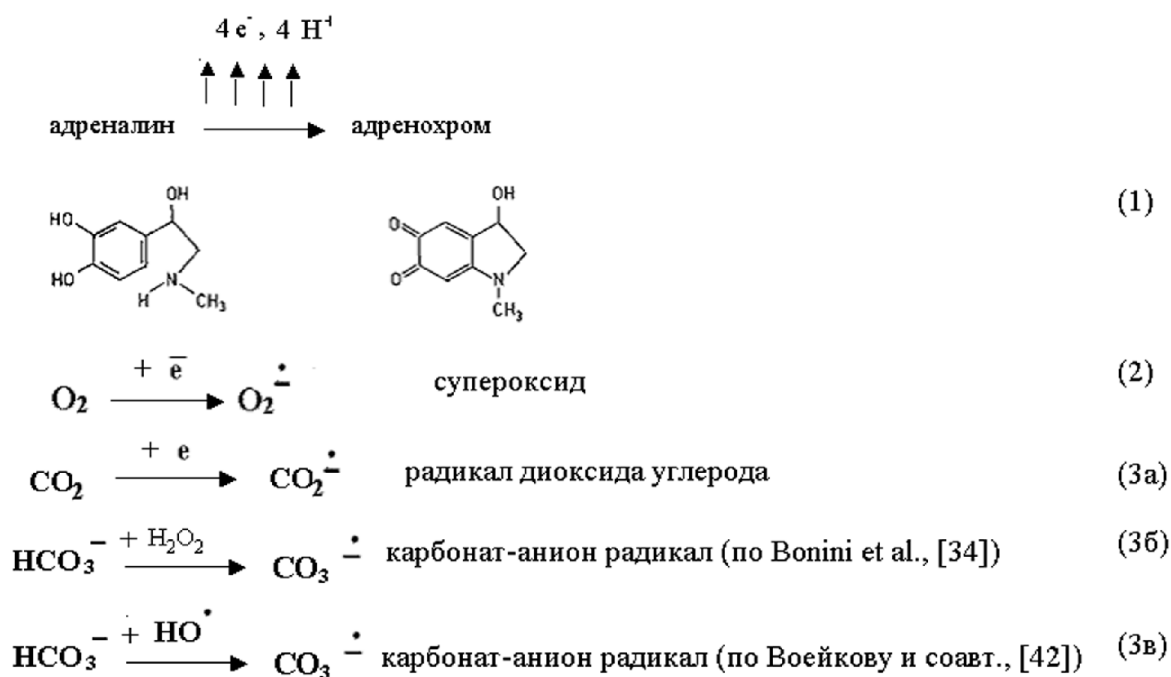


Рисунок 6. Схема процесса превращения адреналина в адренохром и этапы образования различных АФК. Пояснения в тексте.

Карбонат/бикарбонатные буферные системы – это не инертные буферы, а биологически активные компоненты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях и они могут быть мощными прооксидантами. Это необходимо учитывать при использовании подобных буферов в ситуациях, где происходят свободно-радикальные реакции. А это – постоянно протекающие в организме нормальные окислительно-восстановительные процессы и возникающие патологические случаи, связанные с окислительным стрессом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колтаков В.Г. (1974) Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **74**, 1254–1263.
2. Baez S., Segura-Aguilar J., Widersten M., Johansson A.S., Mannervik B. (1997) *Biochem J.*, **324**(Pt 1), 25–28.
3. Rigobello M.P., Scutari G., Boscolo R., Bindoli A. (2001) *Nitric. Oxide*, **5**, 39–46.
4. Fu Y., Buryanovskyy L., Zhang Z. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23829–23835.
5. Fluxá V.S., Wahler D., Reymond J.L. (2008) *Nat. Protoc.*, **3**, 1270–1277.
6. Foppoli C., Coccia R., Cini C., Rosei M.A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 200–206.
7. Rump A.F., Schierholz J., Rösen R., Güttler K., Klaus W. (2001) *Arzneimittelforschung*, **51**, 964–970.
8. Costa V.M., Silva R., Ferreira L.M., Branco P.S., Carvalho F., Bastos M.L., Carvalho R.A., Carvalho M., Remião F. (2007) *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1183–1191.
9. Smythies J., De Iulius A., Zanatta L., Galzigna L. (2002) *Neurotox. Res.*, **4**, 77–81.
10. Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I., Segura-Aguilar J. (2012) *Parkinsons Dis.*, 2012; 2012:920953. doi: 10.1155/2012/920953.
11. Smythies J., Galzigna L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1380**, 159–162.
12. Smythies J. (2000) *Antioxid. Redox. Signal.*, **2**, 575–583.
13. Genova M.L., Abd-Elsalam N.M., Mahdy el S.M., Bernacchia A., Lucarini M., Pedulli G.F., Lenaz G. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **447**, 167–173.
14. Танбергенов С.О. (1982) *Вопр. мед. химии*, **28**(2), 52–58.
15. Северина И.С., Пятакова Н.В., Щеголев А.Ю., Сидорова Т.А. (2008) *Биомед. химия*, **54**, 679–686.
16. Утевский А.М., Танбергенов С.О. (1982) *Укр. биох. ж.*, **54**, 307–310.
17. Misra H.P., Fridovich I. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170–3175.
18. Bindoli A., Rigobello M.P., Galzigna L. (1989) *Toxicol. Lett.*, **48**, 3–20.
19. Marques F., Duarte R.O., Moura J.J., Bicho M.P. (1996) *Biopl. Signals.*, **5**, 275–282.
20. Bors W., Michel C., Saran M., Lengfelder E. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 162–172.
21. Alhasan R., Njus D. (2008) *Anal. Biochem.*, **381**(1), 142–147.
22. Сирота Т.В. (2012) *Биомед. химия*, **58**, 77–87.
23. Сирота Т.В. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 399–410.
24. Сирота Т.В. (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 263–272.
25. Щербаков А.Б., Иванов В.К., Сирота Т.В., Третьяков Ю.Д. (2011) *ДАН*, **437**(2), 197–200.
26. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. (1971) *Справочник по биохимии*, Из-во.: “Наукова Думка”, Киев, с. 882–893.
27. Altman F.P. (1976) *Progr.Histochem.Cytochem.*, **9**(3), 1–52.
28. Bielski B.H.J., Shiue G.G., Bajuk S. (1980) *J. Phys. Chem.*, **84**, 830–833.
29. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) *Anal. Biochem.*, **44**, 276–287.
30. Karunakaran C., Zhang H., Joseph J., Antholine W.E., Kalyanaraman B. (2005) *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 494–500.
31. Ramirez D.C., Gomez Mejiba S.E., Mason R.P. (2005) *Free Rad. Biol. Med.*, **38**, 201–214.
32. Goss S.P., Singh R.J., Kalyanaraman B. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 28233–28239.
33. Medinas D.B., Cerchiaro G., Trindade D.F., Augusto O. (2007) *IUBMB Life*, **59**(4–5), 255–262.
34. Bonini M.G., Gabel S.A., Rangelova K., Stadler K., Derosé E.F., London R.E., Mason R.P. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 14618–14627.
35. Medinas D.B., Toledo J.C.Jr., Cerchiaro G., do-Amaral A.T., de-Rezende L., Malvezzi A., Augusto O. (2009) *Chem. Res. Toxicol.*, **22**(4), 639–648.
36. Bonini M.G., Miyamoto S., Di Mascio P., Augusto O. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 51836–51843.
37. Augusta O., Bonini M.G., Amanso A.M., Linares E., Santos C.C., De Menezes S.L. (2002) *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 841–859.
38. Liochev S.I., Fridovich I. (2006) *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 694–696.
39. <http://www.dpva.info/Guide/GuidePhysics/Solvability/SolvabilityOfSomeGases/>
40. <http://www.o8ode.ru/article/learn/ugaz.htm>
41. http://www.o8ode.ru/article/answer/voda_bez_vozduha_gazov.htm
42. Воейков В.Л., Виленская Н.Д., До Минь Ха, Малышенко С.И., Буравлева Е.В., Яблонская О.И., Тимофеев К.Н. (2012) *Ж. физ. химии*, **86**(9), 1–10.

Поступила: 14. 10. 2013.

INVOLVEMENT OF CARBONATE/BICARBONATE IONS
IN THE SUPEROXIDE-GENERATING REACTION OF ADRENALINE AUTOXIDATION

T.V. Sirota

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; tel.: (7)(4967) 739170;
e-mail: sirotatv@rambler.ru

An important role of carbonate/bicarbonate ions has been recognized in the superoxide generating reaction of adrenaline autooxidation in an alkaline buffer (a model of quinoid adrenaline oxidation in the body). It is suggested that these ions are directly involved not only in formation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$) but also other radicals derived from the carbonate/bicarbonate buffer. Using various buffers it was shown that the rate of accumulation of adrenochrome, the end product of adrenaline oxidation, and the rate of $O_2^{\cdot -}$ formation depend on concentration of carbonate/bicarbonate ions in the buffer and that these ions significantly accelerate adrenaline autooxidation thus demonstrating prooxidant properties. The detectable amount of diformazan, the product of nitro blue tetrazolium (NBT) reduction, was significantly higher than the amount of adrenochrome formed; taking into consideration the literature data on $O_2^{\cdot -}$ detection by NBT it is suggested that adrenaline autooxidation is accompanied by one-electron reduction not only of oxygen dissolved in the buffer and responsible for superoxide formation but possible carbon dioxide also dissolved in the buffer as well as carbonate/bicarbonate buffer components leading to formation of corresponding radicals. The plots of the dependence of the inhibition of adrenochrome and diformazan formation on the superoxide dismutase concentration have shown that not only superoxide radicals are formed during adrenaline autooxidation. Since carbonate/bicarbonate ions are known to be universally present in the living nature, their involvement in free radical processes proceeding in the organism is discussed.

Key words: adrenaline (epinephrine), superoxide, oxygen, nitro blue tetrazolium, adrenochrome, superoxide dismutase, carbonate/bicarbonate ions, carbon dioxide, carbonate radicals, carbon dioxide radicals.