

На правах рукописи

Ткачев Николай Анатольевич

**ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ У КРЫС**

03.01.02 — Биофизика

03.01.04 — Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва — 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Научные руководители:

Зайцев Сергей Юрьевич

доктор биологических наук, доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»

Сереженков Владимир Анатольевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

Официальные оппоненты:

Муранов Константин Олегович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Тимошин Александр Анатольевич

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «17» июня 2015 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/2014/>.

Автореферат разослан «___» апреля 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

1. Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Монооксид азота является важной внутри- и межклеточной сигнальной молекулой. Он служит нейромедиатором, управляет релаксацией сосудов, деятельностью иммунных клеток и регулирует активность множества сигнальных путей в различных клетках. Причём обусловленные им эффекты могут быть весьма многообразны, а зачастую противоположны для разных концентраций, типов клеток и других параметров. Согласно современным представлениям, оксид азота участвует в регуляции биохимических процессов в клетке в виде нескольких форм: непосредственно свободная радикальная форма монооксида азота, нитрозотиолы, нитрозильные комплексы железа и нитрит. В настоящее время все большее число исследователей приходят к пониманию регуляторной функции оксида азота не через низко- и высокомолекулярные нитрозотиолы [Stamler, 2013] или нитрит, восстанавливаемый в кислых зонах клетки или ишемизированных тканях до NO (группа во главе с Марком Глэдвином) [Kim-Shapiro, 2014], а посредством более стабильных димерных нитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами (Б-ДНКЖ) и их мономерных формах (М-ДНКЖ) [Vanin, 2009]. При этом ДНКЖ в одних тканях способны стимулировать регенерацию (показано на моделях кожных ран, инфаркта миокарда, ишемии сетчатки), а в культурах клеток HeLa, Jurkat они оказывают цитотоксическое действие [Gilliano, 2011, Kleschyov, 2006]. ДНКЖ действуют как фактор релаксации сосудов, что показано при купировании гипертонического криза на людях [Chazov, 2012]; предотвращают фиброзные изменения при денервации пениса [Велиев, 2008]. Таким образом ряд экспериментальных данных подтверждает принципиальную возможность выступать регуляторами биохимических процессов как свободного оксида азота, так и его стабильных форм (Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ), вводимых в клетки и ткани. Однако до настоящего времени недостаточно исследованы роль эндогенных и экзогенных ДНКЖ в живых организмах и механизмы их действия.

Представляет интерес исследование воздействия динитрозильных комплексов железа на быстрорастущую, гормонозависимую ткань *in vivo*. В качестве модели такой ткани был выбран патологический процесс индуцированного эндометриоза. Эндометриоз — хроническое заболевание сложной этиологии, оно заключается в массивном разрастании очагов ткани, сходной с нормальным эндометрием, за пределами нормальной локализации — в том числе и вне брюшной полости. Эндометриоз является широко распространённым и социально значимым заболеванием. Несмотря на большое число исследований, посвящённых проблеме эндометриоза, до сих пор остаются невыясненными многие вопросы происхождения,

патологии, клинических особенностей, диагностики и лечения этого заболевания. Эндометриоз занимает третье место по распространенности среди гинекологических заболеваний. Проблема эндометриоза является актуальной и для ветеринарии. У крупного рогатого скота эндометриозом часто осложняется хронический эндометрит (инфекционное воспаление эндометрия) [Katkiewicz, 2011]. Если в крупных хозяйствах животное предпочитают не лечить, а сразу выбраковывать, то в случае заболевания ценного производителя бесплодие или смерть являются серьезной проблемой. Поскольку постоянный стресс и болевой синдром приводят к значительному снижению продуктивности, то лечение становится необходимым. Для домашних и экзотических животных (особенно эндометриозом страдают обезьяны [D'Hooghe, 1996] гибель является трагедией для хозяев. Единственным методом лечения эндометриозидных разрастаний является хирургический, комбинируемый с терапией гормональными препаратами. Однако эти методы дают много осложнений, оставляют высокую вероятность рецидива заболевания (до 60% случаев). Гормональные лекарственные средства дорогостоящи, обеспечивают лишь временные клинические эффекты и обладают нежелательными побочными действиями. [Адамян, 2003, Стрижаков, 2006].

Из вышеизложенного следует необходимость разработки принципиально новых подходов к терапии эндометриоза. Одним из таких подходов может быть применение эндогенных универсальных регуляторов, в частности, монооксида азота (NO) и его стабилизированных форм – а именно, динитрозильных комплексов железа.

Цель и задачи работы. Цель работы: изучение влияния экзогенных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на модель эндометриоза у крыс с оценкой возможности применения этих комплексов для терапии эндометриоза, и сопоставлением их действия с влиянием естественного регулятора — фолликулярного гормона ингибина.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. оценить концентрацию эндогенных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и оксида азота в органах и тканях крыс с модельным эндометриозом;
2. исследовать воздействие низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на течение экспериментального эндометриоза на разных стадиях;
3. определить количество восстановленных тиоловых групп в белке ингибине, для оценки степени его нативности и использования его в качестве гормонального лечебного средства.
4. исследовать воздействие гормона ингибина на течение экспериментального эндометриоза у крыс.

Положения, выносимые на защиту:

1. Терапия низкомолекулярными ДНКЖ с глутатионом в дозе 12 мкмоль/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму, соотношению железистых и стромальных клеток и интенсивности воспалительного процесса;
2. Уровни NO в эндометриоидном очаге и тканях крысы с эндометриозом составляют 2,5-3,6 мкМ, что впервые оценили методом ЭПР-спектроскопии по интенсивности сигналов нитрозильных комплексов гемовых белков;
3. В печени, стенке эндометриоидного очага и брюшине крыс с модельным эндометриозом присутствуют эндогенные белковые ДНКЖ;
4. Количество доступных тиоловых групп в белке ингибине равно 4, что свидетельствует о высокой нативности белка, применяемого для воздействия на эндометриозный процесс;
5. Гормональная терапия ингибином вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму и соотношению железистых и стромальных клеток в эндометриоидном очаге под действием гормона ингибина.

Научная новизна. Впервые в содержимом эндометриоидного очага и в печени обнаружены эндогенные белковые ДНКЖ, что свидетельствует об избыточном присутствии оксида азота и свободного железа (II). Последнее способствует усиленной продукции высокоактивных свободных радикалов при воспалении.

Методом ЭПР-спектроскопии впервые оценили уровни нитрозильных комплексов гемовых белков в эндометриоидных очагах и тканях крысы с эндометриозом.

Показано, что фолликулярный гормон ингибин — регулятор процессов репродуктивной системы, относящийся к сверхсемейству трансформирующих ростовых факторов бета — в супрафизиологических дозах вызывает регресс эндометриоидных очагов.

Показано, что низкомолекулярные ДНКЖ вызывают регресс эндометриоидных очагов. Более выражено это воздействие на ранней стадии образования эндометриоидных очагов.

Практическая значимость. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном терапевтическом действии гормона ингибина на течение эндометриоза у крыс. Они послужили основой для последующих клинических испытаний гормона и дальнейшего утверждения его как лекарственного средства (под наименованием «Эндоферин®», свидетельство №451371) для лечения эндометриоза в медицинской практике.

Результаты данной работы используются в учебном процессе ФГБОУ ВПО

МГАВМиБ по дисциплинам «Биохимия», «Биохимия мембран».

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 09-04-00868aa, 12-04-00346a, также программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2012, 2014).

Личный вклад диссертанта состоял в проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, а также подготовке статей к опубликованию. Все изложенные в диссертации новые результаты получены автором лично или при его непосредственном участии в подготовке и проведении экспериментов.

Апробация результатов. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях: 6-я национальная научно-практическая конференция с международным участием "Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека" (г. Смоленск, 2009 г.); Международная научно-методическая конференция «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (г. Воронеж, 2013 г.); "К 90-летию со дня рождения В.И. Гольданского: химическая физика и строение вещества" (г. Москва, 2013 г.); XXII юбилейные ениколоповские чтения, посвященные 90-летию со дня рождения академика Н.С. Ениколопова (г. Москва, 2014 г.); Международная учебно-методическая и научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», посвященная 95-летию со дня основания ФГБОУ ВПО МГАВМиБ (г. Москва, 2014 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных журналах (в том числе 5 – в журналах, рекомендованных ВАК, и 2 – в зарубежном журнале) и 4 тезиса докладов конференций.

Структура и объём работы. Работа изложена на 119 страницах, включает 41 рисунок, 6 таблиц, список литературы включает 142 источника. Диссертация состоит из введения, 4 глав (литературный обзор, материалы и методы, результаты экспериментов и обсуждение результатов), заключения, выводов, списка литературы, списка используемых сокращений.

2. Основное содержание работы

Во введении охарактеризована тема работы, обоснована её актуальность, определены цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, практическая значимость.

Литературный обзор состоит из трёх подразделов. В первом приводятся данные

литературы о сущности эндометриоза, клинических особенностях, этиологии, а также методах диагностики и терапии этого заболевания. Во втором описываются свойства гормона ингибина и связанные с ним сигнальные механизмы в живых клетках. В третьем рассматриваются свойства монооксида азота NO, его роль в метаболизме и регуляции живых клеток, а также структура и роль его комплексов с железом.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили крысы-самки линии Вистар разводки питомника «Столбовая», массой 180 ± 20 г. Для моделирования эндометриоза была выбрана модификация операции, описанной в статье [Vernon M.W. and Wilson E.A., 1985]. Заболевание моделировали путём пришивания к поверхности брюшины передней брюшной стенки двух фрагментов эндометрия с миометрием 2×2 мм, полученных из левого рога матки (эндометрием внутрь брюшной полости).

Оперативные вмешательства проводились на иммобилизационном станке под тиопенталовым наркозом ($0,06$ г на кг живого веса) в течение 40-45 минут. Животные содержались в виварии в условиях регулируемого светового дня (12×12 часов) и постоянной комнатной температуры ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) на стандартном пищевом рационе и при свободном доступе к воде.

В эксперименте по влиянию ДНКЖ с глутатионом на эндометриоидные очаги животным опытной группы комплекс вводили внутрибрюшинно в дозе 12 мкмоль/кг ежедневно в течение 10 дней (по $0,5$ мл 5 мМ раствор комплекса ДНКЖ с глутатионом). Была сформирована также группа животных, которым вводили комплекс железа с глутатионом, в структуру которого оксид азота не входит. Введение начинали спустя 4 дня после операции или 28 дней, в разных сериях исследований (к этому моменту масса крыс достигала 230 ± 25 г).

Ингибин вводили животным опытной группы внутрибрюшинно в дозе 160 мкг/кг в виде стерильного водного раствора объемом $0,5$ мл ежедневно в течение 10 дней. В ряде опытов перед использованием ингибина его подвергали трёхминутному прогреванию на водяной бане при температуре 100°C (патент №2185180).

Вскрытие осуществлялось на 45 день после операции. После вскрытия брюшной полости имплантаты и другие органы измеряли, фотографировали, отделяли от окружения и замораживали в жидком азоте для исследования методом ЭПР-спектроскопии, а также направляли на гистологическое исследование. Для этого ткани помещали в 20% раствор формалина. После стандартной проводки и заливки образцов ткани в парафин, гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Авторы благодарны д.м.н., профессору О.В. Зайратьянцу и его коллегам НИИ

морфологии человека за помощь при гистологическом исследовании образцов тканей. Авторы благодарны д.м.н. О.В. Паклиной, ФГБУ ГМЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна за помощь в гистологических исследованиях.

Для исследования методом ЭПР-спектроскопии брали образцы крови, печени, брюшной стенки с имплантатами, противоположной брюшной стенки. Образцы тканей помещали в пластмассовую цилиндрическую форму диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте. Сигналы ЭПР регистрировали при температуре жидкого азота ($77\text{ K} = -196^\circ\text{C}$) на спектрометрах Radiopan SE/X 2544 (Польша) и Bruker ECS-106 (Германия), в X-диапазоне, развертка поля 160 мТл и 200 мТл соответственно, Р-мощность СВЧ источника – 10-20 мВт, усиление 10^5 , амплитуда модуляции 0,5 мТл, $\tau = 0,163\text{ с}$. Концентрацию парамагнитных центров оценивали методом двойного интегрирования и сравнения со стандартным образцом.

Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с глутатионом — рисунок 1 — синтезировали путём обработки раствора сульфата железа и раствора глутатиона газообразным NO под давлением 100 мм.рт.ст., при молярном соотношении Fe^{2+} и глутатиона, равным 1:2. Синтез проводили в сосуде Тунберга, содержащем 100 мл газовой фазы и 4,5 мл раствора глутатиона. 0,5 мл раствора сульфата железа в дистиллированной воде (pH 5,5) и раствор глутатиона (4,5 мл) в 15мМ буфере HEPES (pH 7.4) помещали соответственно в верхнюю и нижнюю часть сосуда. Затем после откачки воздуха в сосуд напускали NO, после чего при встряхивании сосуда в присутствии NO смешивали растворы железа и глутатиона, и через 5 минут откачивали NO.

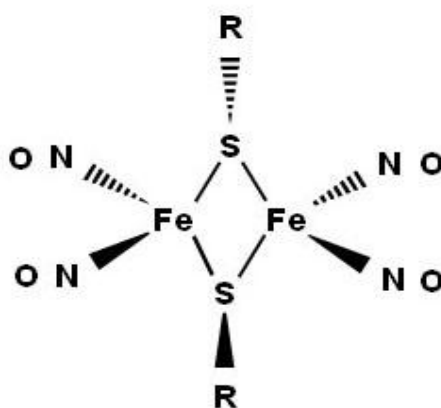


Рисунок 1 Структура биядерного нитрозильного комплекса железа.

В результате в растворе возникали диамагнитные биядерные ДНКЖ (формула $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]_2^{2+}$). Раствор биядерного ДНКЖ имеет срок хранения в 6 месяцев

без потери (окисления) оксида азота.

С целью выяснения степени восстановленности тиоловых групп гормона ингибина опыт по образованию комплексов NO с ингибином проводили следующим образом. Лиофилизированный белок был растворен в дистиллированной воде до концентрации 200 мкг в 300 мкл воды. рН раствора составил 6,3-6,5 при 20°C. К такой пробе добавляли динитрозильный фосфатный комплекс в конечной концентрации 800 мкМ в 300 мкл. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре Bruker ECS-106, H=336 мТл, развертка поля 20 мТл, Р-мощность СВЧ-источника — 10-20 мВт, усиление 10^3 - 10^5 , амплитуда модуляции 0,5 мТл, $\tau=0,163$ с, X-диапазон, температура записи спектров 77 К.

Статистическая обработка данных. Объем имплантатов определяли в мм³ по формуле для эллипсоидов: длина * ширина * высота * $\pi/6$. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0, AnalystSoft BioStat 2009 и Apache Open Office 4. Нормальность распределения выборок оценивали по критерию Колмогорова. Поскольку распределение подавляющего большинства выборок отлично от нормального, им свойственна значительная асимметрия — значимость различий между выборками оценивали при помощи непараметрических методов: U-теста Манна-Уитни-Уилкоксона, критерия Колмогорова-Смирнова.

Результаты экспериментов и их обсуждение

Воздействие на течение экспериментального эндометриоза ДНКЖ с глутатионом и гормона ингибина.

При вскрытии брюшная полость осматривалась на предмет наличия эндометриоидных очагов. У контрольных животных, забитых через 4 недели после операции, наблюдали полное заживление швов и приживление имплантатов. Наряду с разрастанием имплантированной ткани наблюдали спаечные процессы и возникновение дополнительных опухолей на органах брюшной полости. Очаги часто соединены с брыжейкой кровеносными сосудами, покрытыми слоем жировой ткани. Такие же сосуды (отсутствовавшие на момент пришивания имплантатов) подходят к ним по поверхности брюшной стенки. Сводные данные об объёме эндометриоидных опухолей приведены в таблице 1. Имплантаты и опухоли представляют собой либо прозрачные пузырьки, наполненные жидким содержимым, с усиленным ростом мелких кровеносных сосудов в окружающей их ткани (малые «белые» и «красные» имплантаты), либо довольно массивные шарообразные или эллипсоидные

образования цвета хаки, наполненные творожистым содержимым (большие имплантаты). Количество животных с малыми имплантатами (те, сумма объемов которых в одном животном не превышает 20 мм^3) составляет в контроле 22% от общего количества животных, а при терапии ДНКЖ 60%. Количество больших имплантатов и опухолей, размером более 100 мм^3 зафиксировано 25% в контроле и 9% при терапии ДНКЖ. Учитывая специфику терапии эндометриоза, а именно необходимость предупреждения рецидивов после оперативного удаления уже сформировавшихся опухолей — были проведены опыты с введением ДНКЖ с глутатионом на ранней стадии формирования эндометриоидных очагов из пришитых имплантатов — с 4 дня после операции. В эксперименте с ранним введением комплекса отношение между средними величинами объемов имплантатов, полученными для контрольной и опытной групп, для разных серий варьирует в диапазоне 15,5 — 42. Животных с малыми имплантатами в опыте 78%, в контроле таковые отсутствуют. Крупные имплантаты в опыте не наблюдаются, в контроле они составляют 36% от общего числа опухолей. При терапии экспериментального эндометриоза ингибином в дозе 160 мкг/кг отмечается статистически значимое уменьшение размеров очагов в 10 раз (с $113,3 \pm 237,6$ до $11,5 \pm 19,5 \text{ мм}^3$). [Хоперская, 2009, Адамян, 2013, Burgova, 2014]

Таблица 1. Средние объёмы опухолей в разных сериях эксперимента. Приведены результаты сравнения выборок по критериям Манна-Уитни ($p(U)$) и Колмогорова-Смирнова ($p(K)$).

	Средние, мм^3	Медианы, мм^3	Отношение средних контроль/опыт	Значимость отличий от контроля
Контроль	113,3 — 210,7	14,1 — 42,4		
ДНКЖ, введение с 28 сут.	11,4 — 106,5	0,5 — 7,1	15,4	$p(U) < 0,1$ $p(K) < 0,003$
ДНКЖ, введение с 4 сут.	5,0 — 12,0	0,5*	42,0	$p(U) < 0,001$ $p(K) < 0,0003$
Ингибин, введение с 28 сут.	11,5 — 48,3	2,9 — 14,1	10,2	$p(U) < 0,004$ $p(K) < 0,04$

6 серий, 145 животных

При гистологическом исследовании в контрольных образцах наблюдается

наличие эндометриoidных желез, то есть присутствуют клетки эктопического эндометрия с элементами воспаления: заполнение просвета детритом, нейтрофильная инфильтрация; и перерождения ткани — очаг окружен фиброзной псевдокапсулой (рисунок 2, а). В части же опытных образцов наблюдается отсутствие эндометриoidных желез, замещение их фиброзной тканью, отложение коллагена и присутствие зрелых липоцитов (рисунок 2, б). Это говорит о регрессе экспериментального эндометриоза. В некоторых опытных образцах эндометриoidных железах присутствуют дистрофические изменения эпителия и стромы: отсутствие фигур митозов стромальных клеток, толщина стромального слоя уменьшена.

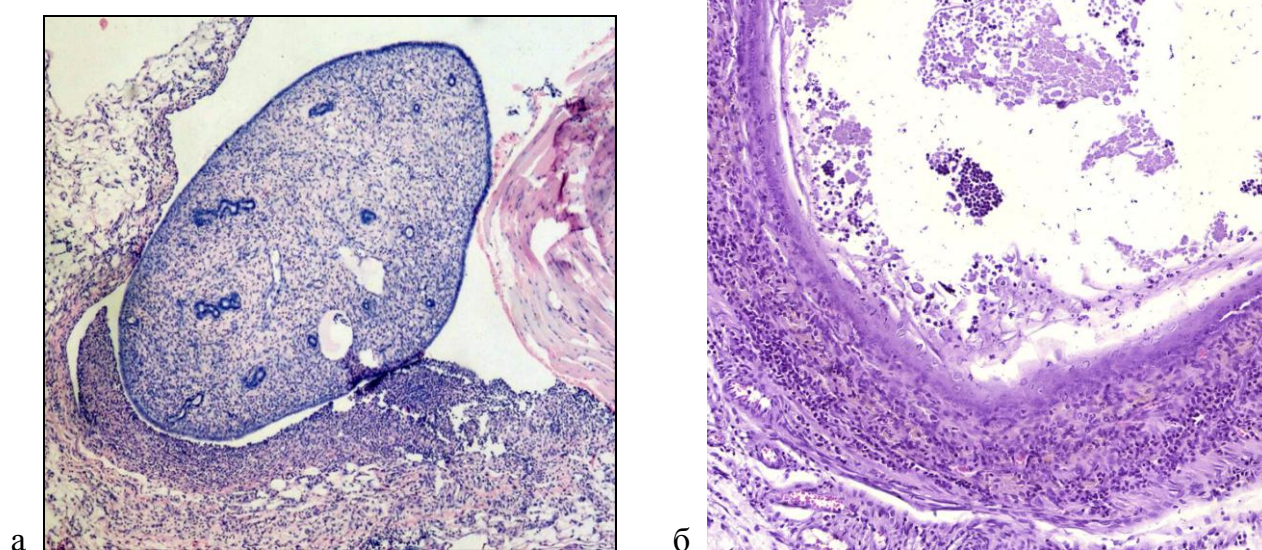


Рисунок 2 Гистологические образцы эндометриoidных очагов, а – контроль, б – после терапии ДНКЖ с глутатионом. Окраска гематоксилином и эозином, а – х40, б – х100.

На гистологических препаратах всех серий видно, что у особей, обработанных ДНКЖ с глутатионом, даже при сохранении фиброзной капсулы наблюдаются явные дистрофические изменения эндометриoidной стромы с массовой лейкоцитарной инфильтрацией. В иных случаях наблюдается полное замещение железистых клеток фиброзной тканью. Таким образом, даже при сохранении размеров опухоли, её быстрый рост и активная эндокринная и паракринная секреция прекращаются.

При терапии ингибином к концу шестой недели эксперимента на месте аутотрансплантата выявляется чаще только тканевой детрит с выраженной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией тканей передней брюшной стенки. Типичны крупные очаги обызвествления. В других случаях еще сохраняется эндометриoidная киста, но в ее стенках наблюдается острое выраженное полнокровие, резко выраженная

воспалительная лейкоцитарная инфильтрация. Кроме того, выстилающий кисту эпителий становится уплощенным, содержимое просвета – хлопьевидным [Хоперская, 2009].

Измеряя продолжительность отдельных болевых приступов через 28 дней после операции, в течение 12 дней, мы обнаружили, что средняя продолжительность отдельных болевых спазмов изменялась в течение всего измеряемого периода времени. Если в начале периода средняя продолжительность спазма для контрольной группы колебалась возле значения 14-15 секунд, то в конце она составляла 7-10 секунд. Для опытной группы в конце измеряемого периода продолжительность приступа составляла 3-5 секунд. Сопоставление средних продолжительностей болевых приступов показывает, что в контрольной группе оно уменьшается медленнее. Общая продолжительность приступов за период наблюдения изменялась в течение курса введения ДНКЖ. При сравнении общей продолжительности болевых приступов за период наблюдения в контрольной и опытной группах обнаружено, что медиана в опытной группе в 4 раза меньше, чем в контроле (56 сек. против 222 сек.) [Адамян, 2013, Burgova, 2014].

Содержание оксида азота в тканях и органах животных с эндометриозом

Для выявления синтеза NO животным с индуцированным эндометриозом 4-х недель развития за час до забоя вводили экзогенную ловушку — диэтилдитиокарбамат (ДЭТК) натрия и сульфат двухвалентного железа. Возникающий из них комплекс ДЭТК с Fe^{2+} и NO образует парамагнитные моонитрозильные комплексы железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), характеризующиеся при 77 К сигналом ЭПР с центром при $g = 2,04$ и триплетной сверхтонкой структурой с расщеплением 1.2 мТ. Обнаружение этого сигнала при наших измерениях затруднялось из-за появления в образцах комплексов ионов Cu^{2+} с ДЭТК, характеризующихся 4-компонентной сверхтонкой структурой (СТС) (рисунок 3). Обнаруживалась только высокополевая компонента триплетной СТС, указанная на этом рисунке стрелкой. Как видно из приведённых на рисунке 3 сигналов ЭПР, эта компонента обнаруживалась в образцах эндометриоидных очагов у контрольных животных (а). Она не обнаруживалась в образцах животных, обработанных ДНКЖ (б) и в образцах ткани стенки брюшины, взятых у интактных животных (без эндометриоза). В обоих последних наблюдался только сигнал ЭПР комплексов Cu^{2+} с ДЭТК.

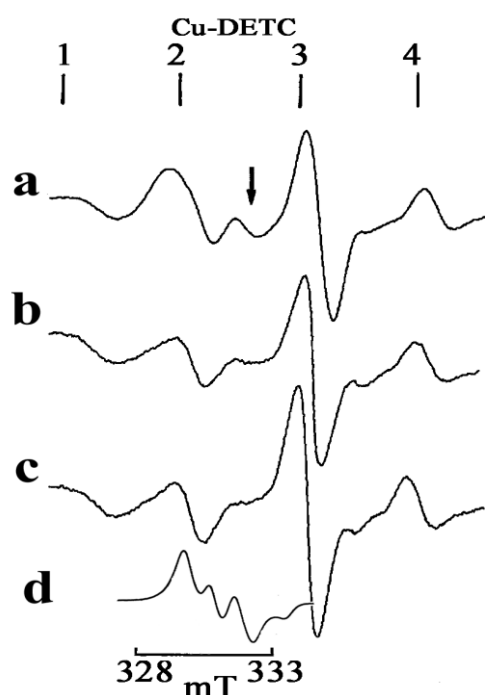


Рисунок 3 Сигналы ЭПР МНКЖ-ДЭТК и комплексов Cu^{2+} с ДЭТК в тканях крыс.

А – сигнал ЭПР образца эндометриоидного очага контрольной крысы (45 суток после операции);

б – сигнал ЭПР образца эндометриоидного очага крысы после терапии ДНКЖ;

с – сигнал ЭПР образца ткани стенки брюшины интактной крысы;

д – типичный сигнал мононитрозильного комплекса железа.

Всем животным введён в качестве ловушки NO комплекс железа с ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К. Усиление 10^5 , а. м. 5 Гс, 1 накопление.

Кроме применения экзогенной ловушки ДЭТК, содержание в тканях оксида азота было оценено по концентрации нитрозильных комплексов гемсодержащих белков. Измерения показали, что в образцах тканей контрольных животных регистрируется высокий уровень NO, обеспечивающий образование М-ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемовых белков.

Полученные количественные данные приведены в таблице 2. Как видно из таблицы, оксид азота, связанный с гемоглобином, содержится в организме крыс с эндометриозом в микромолярных концентрациях. Разности значений концентраций в опыте при терапии ингибином и контроле недостаточны для того, чтобы считать изменения статистически значимыми, однако наблюдается снижение содержания NO в печени, стенке брюшины, противоположной к имплантату и брюшной стенке рядом с имплантатом (на расстоянии 5-10 мм). В кишечнике, селезенке и самом имплантате наблюдается повышение концентрации NO.

Таблица 2 Концентрация оксида азота в тканях и органах крыс.

	Контроль, мкМ ($M \pm SD$)	Терапия ингибином, мкМ ($M \pm SD$)
Кровь	$2,5 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,7$
Кишечник	$2,9 \pm 0,9$	$3,5 \pm 0,7$
Селезёнка	$3,6 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,9$
Печень	$2,9 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,7$
Противоположная стенка	$2,5 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,8$
Стенка 5 мм от имплантата	$2,5 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,6$
Зона имплантата	$1,6 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,2$

Спектры ЭПР эндогенных парамагнитных центров, возникающих в содержимом эндометриоидных очагов опытных животных, представлены мономерной формой ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими группами белков (они обнаруживаются в спектрах ЭПР по компоненте при $g=2,035$). Помимо сигнала свободных радикалов при $g=2,0$ регистрируется и сигнал ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина с характерными значениями g -фактора в районе 2,07-1,98 и триплетной СТС. Как известно из литературы, сигнал ЭПР М-ДНКЖ характеризуется двумя значениями g -фактора: $g_{\perp}=2,035$, $g_{\parallel}=2,014$, $g_{ср.}=2,03$. Амплитуда его компоненты при g_{\parallel} не обнаруживается из-за наложения на неё первой компоненты СТС сигнала ЭПР нитрозогемоглобина (нитрозомиоглобина), поэтому только по амплитуде сигнала ЭПР М-ДНКЖ при $g=2,035$ трудно оценить концентрацию этих комплексов в образцах эндометриоидных очагов. Эта задача решается вычитанием модельного нитрозокомплекса гемоглобина из суммарного спектра ЭПР эндометриоидных очагов с определенным коэффициентом (весом). Такая процедура предусмотрена программным обеспечением ЭПР спектрометра Bruker ECS-106. Модельный нитрозокомплекс гемоглобина получен обработкой эритроцитов крови с известной концентрацией гемоглобина донором оксида азота – нитрозоглутатионом RSNO. Концентрация М-ДНКЖ в образцах очагов контрольных животных варьирует в диапазоне 0,4 — 0,8 мкМ.

В образцах, взятых у обработанных ДНКЖ крыс, и включающих в себя сохранившийся небольшой по размерам очаг и окружающую его ткань стенки брюшины, наблюдались сигналы ЭПР М-ДНКЖ. ЭПР сигнал нитрозильных комплексов гемоглобина также регистрируется наряду с сигналом эндогенных свободных радикалов, и в печени составляет 3,2 мкМ. В крови контрольных животных сигнал 2,03 не наблюдается, но при введении опытным животным димерной формы ДНКЖ он регистрируется через час после введения в виде мономерной формы, и при этом наблюдается возрастание сигнала ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина.

Структура комплекса NO с ингибином как супрамолекулярной биологической системы.

На раннем этапе исследований было существенным определить, насколько белок остаётся нативным после выделения и последующего разведения; а также проверить ранее показанные данные, что трехминутное нагревание растворенного белка на водяной бане при 100°C позволяет восстановить биологическую активную структуру гормона. Для этого была проведена оценка количества восстановленных тиоловых

групп в белке по их способности взаимодействовать с железом и оксидом азота и формировать моно- или динитрозильные комплексы.

Согласно процедуре активации препарата его подвергали трёхминутному прогреванию на водяной бане при 100°C. Форма ЭПР-спектров раствора ингибина при рН 7,2-7,4 показывает, что при добавлении фосфатного ДНКЖ (спустя три минуты после прогрева) группировка Fe(NO)₂ переходит на белок, так как имеет более высокое сродство к тиоловому лиганду (рисунок 4). При этом белок выступает донором одного атома серы из аминокислотного остатка цистеина для формирования ДНКЖ, в качестве второго лиганда скорее всего выступает атом кислорода фосфатного аниона. При повышении температуры регистрации с 77 К до 293 К (20°C) в спектре ЭПР наблюдается сигнал высокомолекулярного динитрозильного комплекса железа, что свидетельствует о локализации группировки Fe(NO)₂ на белке.

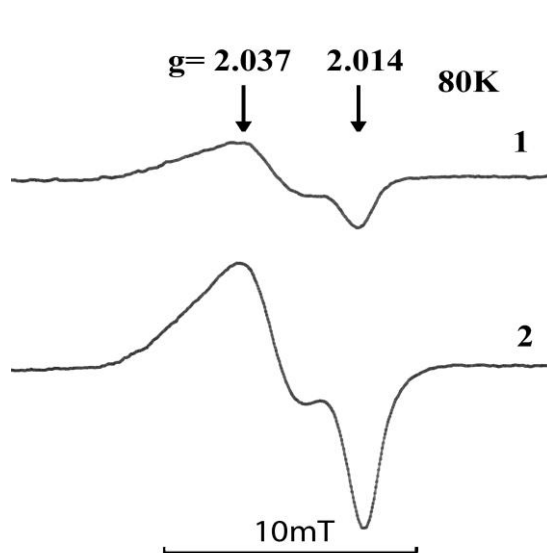


Рисунок 4 Спектры ЭПР водного раствора белка ингибина при рН 7,2-7,4 при трехминутном прогревании (спектр 1) и без нагревания (спектр 2).

При растворении лиофилизованного ингибина в воде значение рН составляет 6,3-6,5, а при добавлении ДНКЖ с фосфатными лигандами смещается до рН 7,2-7,4. Концентрация белка 12,5 мкМ.

Условия: ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 10⁵, а. м. 5 Гс, 1 накопление.

По форме полученных ЭПР сигналов белка ингибина и ранее изученных белков можно предполагать, что при рН 7,2-7,4 одна тиоловая группа белка ингибина участвует в формировании ДНКЖ. Из анализа спектра ЭПР можно видеть, что интенсивность сигнала ЭПР прогретого белка меньше примерно в 3-4 раза, что связано, по-видимому, с окислением части тиоловых групп при нагревании.

При повышении рН до 8,8-9,0 без нагревания белка наблюдается принципиально иная картина. Спектр ЭПР (рисунок 5, спектр 1) представляет собой суперпозицию двух сигналов от белка с фосфатными лигандами (спектр 2) и белка с тиоловыми лигандами (спектр 3). Форма сигнала ЭПР (спектр 3) свидетельствует об образовании на белке моонитрозильного комплекса железа, четыре лиганда которого являются остатками цистеина (спектр 3).

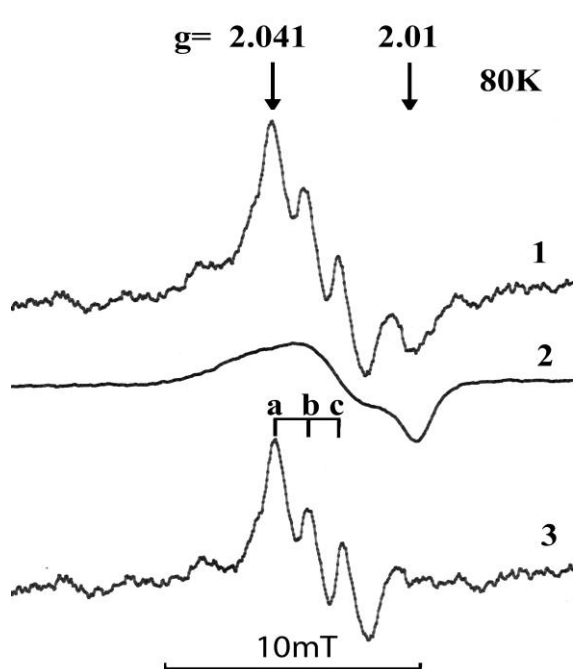


Рисунок 5 Спектры ЭПР белка ингибина без прогревания, конечное значение рН 8,8-9,0. Концентрация белка 12,5 мкМ.

1 – суперпозиция двух сигналов ЭПР
2 – сигнал ЭПР ДНКЖ с фосфатными лигандами
3 – сигнал ЭПР моонитрозильного комплекса железа.

Условия: ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 5×10^5 (спектр 1 и 2), усиление 10^5 (спектр 3), а. м. 5 Гс, 1 накопление.

Подобный моонитрозильный комплекс железа обнаруживается при выдерживании белка ингибина после прогревания при рН 7,2-7,4 в течение 50 минут и более при 20°C. (рисунок 6, спектр 3). Спектр ЭПР моонитрозильного комплекс железа получен путем вычитания из спектра 2, он представляет собой суперпозицию двух сигналов ЭПР — сигнала ЭПР ДНКЖ с фосфатными лигандами, записанного при значении рН 7,2-7,4.

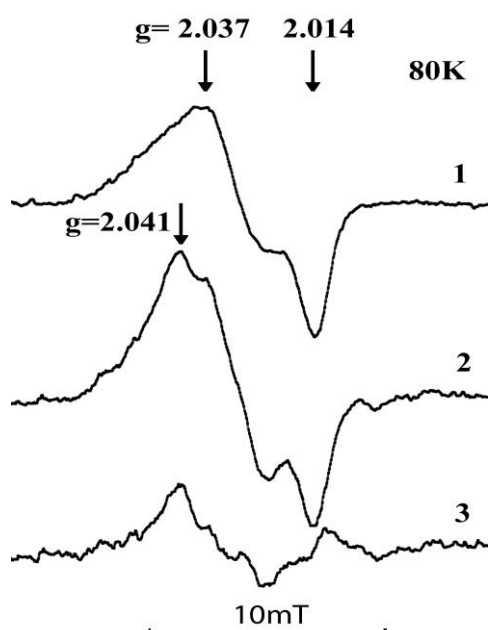


Рисунок 6 Спектры ЭПР белка ингибина после трехминутного прогревания, конечное значение рН 7,2-7,4.

1 – сигнал ЭПР ДНКЖ с фосфатными лигандами
2 – суперпозиция двух сигналов ЭПР
3 – спектр ЭПР моонитрозильного комплекс железа

Концентрация белка 12,5 мкМ. Условия: ECS-106 Bruker, 77 К, усиление 10^5 , 1 накопление.

По нашим оценкам, число связанных атомов железа (в виде ДНКЖ) на одну молекулу ингибина составляет 2-3, то есть одна белковая глобула содержит 4-6

химически активных цистеиновых остатков. Таким образом, с большой долей уверенности можно говорить о том, что температурная активация ингибина способствует возникновению конформации белка, близкой к нативной и обладающей биологической активностью. При pH = 8,8-9,0 образованные моонитрозильные комплексы железа с тиоловыми лигандами доказывают присутствие восстановленных групп и высокую степень его нативности.

Механизмы биологического действия ДНКЖ

Биологические механизмы противоопухолевого действия ДНКЖ до настоящего времени являются объектом активного изучения, но единого мнения ещё не выработано. Возможным принципом их работы является образование комплексов с сигнальными молекулами либо функционирование в роли доноров ионов нитрозония (NO^+) [Vanin, 2009], что приводит к нитрозилированию молекул-мишеней. Модификация внутриклеточных медиаторов может сдвигать баланс множества сигнальных систем с пролиферации клеток к запуску их апоптоза. Именно на роль нитрозильных комплексов наводит отмечаемое многими исследователями разнообразие биологического действия NO; так, в нормальных условиях он стимулирует рост и выживание клеток, но в повышенных концентрациях и при избытке свободного железа проявляется его способность стимулировать проапоптотические сигнальные пути [Kim, 2000]. Также следует учитывать и косвенное воздействие на рост эндометриоидного очага за счёт способности NO в повышенных концентрациях угнетать ангиогенез [Groothuis, 2005]. С другой стороны, он способствует ангиогенезу, через активацию цГМФ-зависимой протеинкиназы (сGPK1) стимулируя экспрессию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [Ziche, 2001]. Это показано как в здоровых клетках, так и в опухолевых; ингибиторы NO-синтаз предлагаются в качестве противоопухолевого лечебного средства, а доноры NO — для стимуляции ангиогенеза, например, после ишемии. [Hoeber, 2004, Baum, 2004]

Биохимический механизм действия ингибина заключается в связывании его с TGF β -рецепторами, и таким образом блокировании действия факторов того же семейства (например, активина), через активацию транскрипционного фактора NF- κ B стимулирующих ангиогенез и пролиферацию клеток [Whitman, 2005].

Согласно литературным данным оксид азота, синтезируемый в организме при участии различных NO-синтаз, осуществляет запуск множества биохимических и физиологических процессов, опосредованных цГМФ, а также инициированием S-

нитрозирования тиоловых групп различных белков (RS-NO), значительно изменяющих свою активность. Согласно концепции А.Ф. Ванина и соавт., такой процесс осуществляется окисленной формой NO — ионами нитрозония (NO^+). М-ДНКЖ с тиоловыми лигандами, выступающие как мощные регуляторы метаболических процессов, способны влиять на эти процессы через уровень высокомолекулярных (белковых) нитрозотиолов в организме. NO^+ -донорная активность ДНКЖ с цистеином и глутатионом была обнаружена при действии этих комплексов на бычий сывороточный альбумин, на активность гуанилатциклазы [Boese, 1995, Mayer, 2009, Vanin, 2009, Borodulin, 2013]. Представляются особенно важными эксперименты по действию ДНКЖ на образование RS-NO в культуре клеток RAW264,7 [Kim, 1998]. Хелатор железа салицилальдегидизоникотингидразол, проникающий в клетку, предотвращал образование в них ДНКЖ, и, как следствие, не наблюдалось образование нитрозотиола. Подобное ингибирование синтеза RS-NO в дрожжевых клетках угнеталось хелатором железа — фенантролином [Foster, 2009]. Согласно имеющимся данным о структуре ингибина, в первичной последовательности белка имеются 5 свободных цистеиновых остатков. Как показали наши исследования, в опытах *in vitro* ингибин действительно способен образовывать динитрозильные комплексы железа и, выступая донором NO и NO^+ , может модифицировать рецепторы. И таким образом, в зоне эндометриоидного очага в условиях высоких локальных концентраций NO (10 мкМ) и железа (100 мкМ), ингибин может изменить своё действие в результате его модификации. Вследствие высокого сродства группировки $\text{Fe}(\text{NO})_2$ к тиолсодержащим лигандам белка образуются достаточно стабильные белковые ДНКЖ, что может реализоваться при применении гормона ингибина в качестве лекарственного средства [Хопёрская, 2009]. В связи с этим предполагается, что NO или NO^+ с ДНКЖ ингибина могут передаваться к мишеням их действия — рецепторным белкам при участии посредников — низкомолекулярных ДНКЖ [Ванин, 2014].

3. Заключение

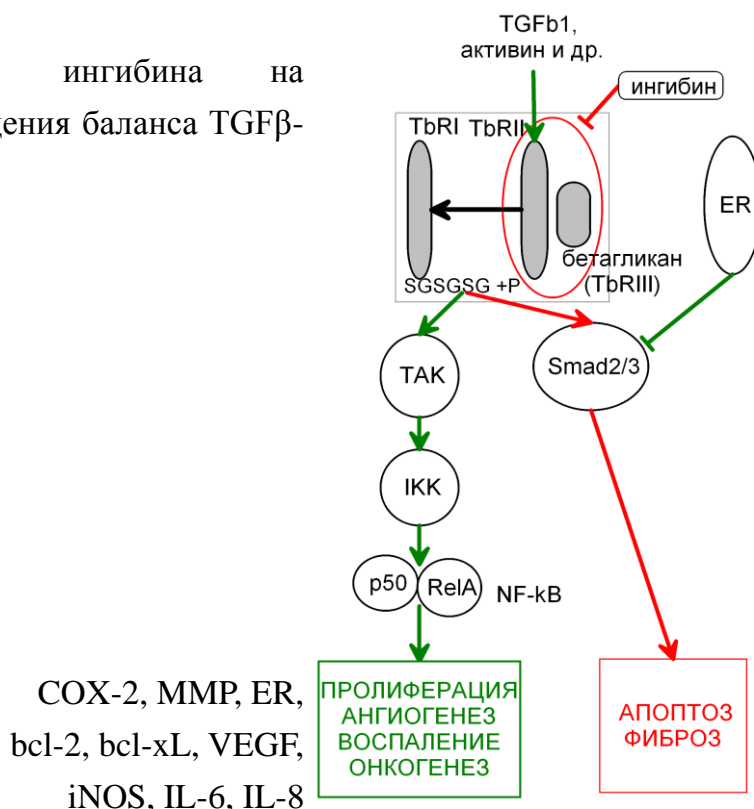
В основе данной работы лежит исследование влияния нитрозильных комплексов железа на быстрорастущие ткани на примере модели индуцированного эндометриоза — заболевания, заключающегося в разрастании эктопических очагов эндометриоидной ткани в условиях хронического воспаления. В данной работе впервые показано, что введение в организм животных с индуцированным эндометриозом низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа приводит к угнетению роста патологической ткани — эндометриоидных образований — и

регрессу их активно секретирующей железистой составляющей. Особенно это выражено на стадии быстрого роста эндометриoidных очагов. Мы склонны полагать, что ДНКЖ не только служат донорами оксида азота, но и в силу высокого сродства к тиоловым группам могут сами модулировать активность белков, в том числе сигнальных молекул и рецепторов [Сереженков, 2015].

Методом ЭПР-спектроскопии впервые оценено характерное для такого заболевания содержание монооксида азота в тканях организма. Также впервые установлено присутствие в тканях опытных животных при эндометриoidном патологическом процессе белковых динитрозильных комплексов железа.

Исследовано воздействие на индуцированный эндометриоз гормона фолликулов ингибина. Установлено, что введение ингибина в дозировке, на 2-3 порядка превышающей его нормальный уровень в организме, позволяет блокировать воспалительные процессы и пролиферацию эктопических эндометриoidных очагов. Это означает, что после начала введения ингибина блокируется рост сформировавшихся очагов и образование новых.

Рисунок 7 Воздействие ингибина на метаболизм клетки путём смещения баланса TGF β -зависимых сигнальных путей.



При этом гибнут железистые клетки очага, блокируется формирование новых сосудов и инициируется запуск сформированных ранее. Механизм действия ингибина — блокирование II и III субъединиц TGF β -рецептора. Основанная на данных литературы схема на рисунке 7 показывает эффекты блокируемых ингибином TGF β -зависимых сигнальных каскадов. Определяющим моментом влияния этого

гормона можно считать блокирование пути активации транскрипционного фактора NF-κB.

Резюмируя вышесказанное, можно предположить, что введение избыточного количества гормона ингибина смещает вектор системы внутриклеточных сигналов, переключая метаболизм секретирующих клеток эндометриоидного очага с пролиферации на апоптоз.

В тексте диссертации приведены сформированные автором на основе современных литературных данных две схемы воздействия на вышеупомянутую систему сигнальных путей, отвечающих на воздействие ингибина (рисунок 7), а также универсальной сигнальной молекулы — оксида азота.

Результаты данной работы важны для понимания закономерностей функционирования белков и регуляции их активности. В настоящее время основными механизмами этой регуляции является модификация белков посредством присоединения различных группировок (таких как фосфат, нитрогруппа, аргинин, ацетат и т. п.). Можно предполагать, что присоединение высвобождаемой из низкомолекулярных и белковых ДНКЖ группировки Fe(NO)₂ приводит к посттрансляционному изменению функции белков и является принципиально новым эффектором белковой активности.

Практические рекомендации. Полученные в данной работе экспериментальные данные послужили основой для создания и последующего клинического испытания препарата «Эндоферин®» (действующее вещество — гормон ингибин) для лечения эндометриоза. Препарат «Эндоферин®» утвержден как лекарственное средство (свидетельство №451371) для применения в медицинской практике. Дальнейшее исследование регуляторных функций ДНКЖ создаёт предпосылки для разработки принципиально новой стратегии терапии эндометриоза и других заболеваний.

Выводы

1. Терапия низкомолекулярными ДНКЖ с глутатионом в дозе 12 мкмоль/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму (в 1,4-2,7 раз по отношению к контролю на поздних стадиях роста, до 42 раз при терапии на ранних стадиях). В эндометриоидном очаге под действием экзогенных ДНКЖ наблюдается изменение соотношения железистых и стромальных клеток, снижается концентрация оксида азота.

2. Методом ЭПР-спектроскопии по интенсивности сигналов нитрозильных комплексов гемовых белков впервые оценили уровни NO в эндометриоидном очаге и тканях крысы с эндометриозом. Показано, что концентрация оксида азота варьирует в зависимости от ткани в диапазоне от 2,5 до 3,6 мкМ.
3. Впервые в печени, стенке эндометриоидного очага и прилежащих тканях крыс с модельным эндометриозом обнаружены белковые ДНКЖ, их концентрация составляет 0.2-0.7 мкМ.
4. Методом ЭПР-спектроскопии определено количество восстановленных тиоловых групп в белке ингибине, равное 4, что свидетельствует о высокой нативности белка, применяемого для воздействия на эндометриозный процесс.
5. Терапия гормоном ингибином в дозе 160 мкг/кг вызывает регресс эндометриоидных очагов по объёму (в 4,3-17,5 раз по отношению к контролю). Гистологическими исследованиями показано изменение соотношения железистых и стромальных клеток в эндометриоидном очаге под действием гормона ингибина.

Публикации по теме диссертации

Статьи

1. Хоперская О.А. Влияние препарата «Индаптин» на экспериментально индуцированный эндометриоз у крыс / О.А. Хоперская, А.В. Ильичев, А.П. Бельков, Е.Н. Бургова, В.А. Сереженков, Н.А. Ткачев, М.М. Сонова, К.С. Маилова, О.В. Зайратьянц, Л.В. Адамян, А.Ф. Ванин // Проблемы репродукции. — 2009. — N. 5. — С. 52-58.
2. Бургова Е.Н. Динитрозильные комплексы железа с цистеином тормозят развитие экспериментального эндометриоза у крыс / Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2012. — Т. 57. — N 1. — С. 105-109
3. Адамян Л.В. Динитрозильные комплексы железа с глутатионом купируют экспериментальный эндометриоз у крыс / Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, В.Д. Микоян, А.А. Степанян, М.М. Сонова, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2013. — Т. 58, Вып. 2. — С.302–312
4. Адамян Л.В. Применение динитрозильных комплексов железа с глутатионом снижает болевые проявления у крыс с экспериментальным эндометриозом / Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев, В.Д. Микоян, А.А. Степанян, А.А. Цыганов, А.Ф. Ванин // Проблемы репродукции. —

2013. — N 5. — С.73-80.

5. Ванин А.Ф. Физико-химическое обоснование лечебного действия на эндометриоз динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами / А.Ф. Ванин, Л.В. Адамян, Е.Н. Бургова, Н.А. Ткачев // Биофизика. — 2014. — Т. 59, Вып. 4. — С. 766–776
6. Burgova E.N. Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress experimental endometriosis in rats / E.N. Burgova, N.A. Tkachev, L.V. Adamyan, V.D. Mikoyan, O.V. Paklina, A.A. Stepanyan, A.F. Vanin // European Journal of Pharmacology. — 2014. — Volume 727. — pp. 140–147
7. Burgova E.N. Effects of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats: A comparative studies / E.N. Burgova, N.A. Tkachev, L.V. Adamyan, O.V. Paklina, V.D. Mikoyan, A.F. Vanin // European Journal of Pharmacology. — 2014. — Vol. 741. — pp. 37-44
8. Сереженков В.А. Ингибирующее влияние доноров оксида азота: моно- и биядерных динитрозильных комплексов железа, нитрозотиола на основе глутатиона и метформина на модельный эндометриоз крыс / В.А. СЕРЕЖЕНКОВ, Н.А. ТКАЧЕВ, М.И. КУЗНЕЦОВА, С.Ю. ЗАЙЦЕВ // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2015. — № 2. — С. 39-46.

Тезисы

9. Burgova E.N. Nitric oxide donors in treatment rat model of endometriosis / E.N. Burgova, V.A. Serezhenkov, N.A. Tkachev, R.M. Ionova, L.V. Adamyan, A.F. Vanin // «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека. Материалы конференции». — Смоленск. — 2009. — С. 139
10. Hoperskaya O.A. Influence of “Indaptin” on experimental rat endometriosis / O.A. Hoperskaya, L.V. Adamyan, E.N. Burgova, O.V. Zayratyanz, V.A. Serezhenkov, N.A. Tkachev, M.M. Sonova, A.F. Vanin // «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека. Материалы конференции». — Смоленск. — 2009. — С. 140
11. Serezhenkov V.A. Reactive nitrogen species in rat model of endometriosis / V.A. Serezhenkov, E.N. Burgova, O.A. Hoperskaya, N.A. Tkachev, A.F. Vanin // «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека. Материалы конференции». — Смоленск. — 2009. — С. 139

12. Ткачев Н.А. Влияние динитрозильных комплексов железа на экспериментальный эндометриоз у крыс / Н.А. Ткачев, Е.Н. Бургова, А.Ф. Ванин // Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы. Материалы докладов Международной научно-методической конференции. — Воронеж. — 2013. — С. 77-78

Список используемых сокращений

AP-1 — активирующий протеин - 1
 BMP — морфогенетический протеин кости
 cGMP, цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат
 cGPK — цГМФ-зависимая протеинкиназа
 COX-2 — циклооксигеназа II типа
 DETC, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат
 DNIC, ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа
 EDRF — эндотелиальный фактор релаксации
 eNOS — эндотелиальная NO-синтаза (I типа)
 GSH — глутатион
 HPLC — жидкостная хроматография высокого разрешения
 IKK — ингибитор каппа-B киназа
 iNOS — индуцибельная NO-синтаза (II типа)
 IκB — ингибитор каппа-B
 JNK — c-Jun N-концевая киназа
 LPS — липополисахариды
 MAPK — митоген-активируемые протеинкиназы
 NF-κB — ядерный фактор каппа B
 nNOS — нейрональная NO-синтаза (III типа)
 SDS — натрия додецилсульфат
 TGFβ — трансформирующий ростовой фактор бета
 TNFα — фактор некроза опухоли альфа
 VEGF — эндотелиальный фактор роста сосудов
 АКМ — активированные кислородные метаболиты
 РНР — рибонуклеотидредуктаза
 СТС — сверхтонкая структура (спектра ЭПР)
 ЭПР — электронный парамагнитный резонанс