

Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»  
Институт Биохимии им. А.Н. Баха

**На правах рукописи**

Пугаченко Игорь Сергеевич

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА НА  
ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ**

Диссертация  
на соискание ученой  
степени кандидата  
биологических наук

1.5.4. Биохимия

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук  
Космачевская Ольга Владимировна

**Москва 2023**

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список используемых сокращений .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Свободные радикалы и окислительный стресс .....	13
1.1.1. Свободные радикалы и их роль .....	13
1.1.2. Перекисное окисление липидов, образование радикалов липидов ...	19
1.2. Метаболиты оксида азота: образование, свойства, биоактивность .....	23
1.2.1. Образование и действие оксида азота в биологических системах ...	23
1.2.1. Нитрозотиолы .....	28
1.2.2. Динитрозильные комплексы железа .....	33
1.2.3. Нитроксильный анион (нитроксил) .....	51
1.2.4. Экзогенные доноры оксида азота и нитроксила .....	56
1.3. Карбонильный стресс в биологических системах .....	59
1.3.1. Карбонильный стресс и активные карбонильные соединения .....	59
1.3.2. Конечные продукты гликирования .....	60
1.3.3. Анти- и дегликирующие стратегии .....	65
1.3.4. Роль карбонильного стресса в биологических системах .....	72
1.3.5. Взаимосвязь КПП с окислительным и нитрозативным стрессами ...	76
1.3.6. Карбонильный стресс в бактериях .....	80
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	84
2.1. Использованные реактивы .....	84
2.2. Синтез нитрозотиолов, динитрозильных комплексов железа и пероксинитрита .....	85

2.3. Получение токофероксильного радикала (раздел 3.2.2.).....	86
2.4. Продукция свободных радикалов с участием азоинициаторов (раздел 3.1.1.).....	86
2.5. Получение липосом и мицелл из жирных кислот (раздел 3.1.1.) .....	86
2.6. Перекисное окисление липидов, индуцированное медью (раздел 3.1.1.) .....	87
2.7. Модельная система соокисления липидов и глюкозы (раздел 3.1.1.) ..	88
2.8. Получение изолированных митохондрий (раздел 3.2.1.).....	88
2.9. Регистрация спектров ЭПР (раздел 3.1.1.).....	89
2.10. Использование метода хемилюминесценции для определения активных форм кислорода и азота в модельных системах (раздел 3.1.1.)..	90
2.11. Получение модифицированного метилглиоксалем гемоглобина. Влияние соли Ангели и аминогуанидина (раздел 3.3.1.).....	91
2.12. Измерение конечных продуктов гликирования (раздел 3.3.1.).....	92
2.13. SDS-электрофорез в ПААГ (разделы 3.1.2. и 3.3.1.) .....	92
2.14. Гель-проникающая хроматография (раздел 3.3.1.).....	93
2.15. Окислительная модификация гемоглобина гидропероксидом <i>трет</i> -бутила (раздел 3.3.1.) .....	93
2.16. Определение белковых карбониллов (раздел 3.3.1.).....	93
2.17. Содержания гемовой группы (раздел 3.3.1.).....	94
2.18. Оценка антиоксидантных/антирадикальных свойств нитроксила (раздел 3.3.1.).....	94
2.19. Выращивание клеток <i>Escherichia coli</i> (раздел 3.3.2.).....	97
2.20. Получение белкового экстракта из клеток <i>E. coli</i> . (раздел 3.3.2.).....	97
2.21. Измерение флуоресценции растворимых белков из клеток <i>E. coli</i> . (раздел 3.3.2.).....	98

2.22. Определение жизнеспособности клеток <i>E. coli</i> . (раздел 3.3.2) .....	98
2.23. Окисление дигидрородамина пероксинитритом (раздел 3.1.2.) .....	98
2.24. Определение восстановленных тиоловых групп (раздел 3.1.2.) .....	99
2.25. Окислительная модификация бычьего сывороточного альбумина (раздел 3.1.2.) .....	100
2.26. Статистическая обработка.....	100
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	101
3.1. Антиоксидантное действие ДНКЖ с различными лигандами при окислении белков и липидов в модельных системах .....	101
3.1.1. Антиоксидантное действие глутатионовых ДНКЖ при перекисном окисления липидов.....	101
3.1.2. Действие прооксидантов на тиоловые лиганды ДНКЖ .....	105
3.2. Образование ДНКЖ в митохондриях. Роль нитроксила. ....	119
3.2.1. Синтез ДНКЖ с участием S-нитрозотиолов и нитроксила .....	119
3.2.2. Взаимодействие нитроксила с токоферолом.....	126
3.3. Антиоксидантное и антигликирующее действие нитроксила.....	129
3.3.1. Влияние нитроксила на модификацию гемоглобина гликированием и окислением.....	129
3.3.2. Влияние нитроксила на клетки <i>Escherichia coli</i> , выращенные в условиях карбонильного стресса.....	145
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157

### Список используемых сокращений

- АКС – активные карбонильные соединения,  
АФА – активные формы азота,  
АФК – активные формы кислорода,  
БСА – бычий сывороточный альбумин,  
ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа,  
ДТПА – диэтилентриаминопента-уксусная кислота,  
КППГ – конечные продукты гликирования,  
ЛНП – липопротеиды низкой плотности,  
МДА – малоновый диальдегид  
МТТ – дифенилтетразолий бромид,  
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты,  
ПОЛ – перекисное окисление липидов,  
СОД – супероксиддисмутаза  
СТС – сверхтонкая структура,  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота,  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс,  
AcCys-ДНКЖ / GS-ДНКЖ / ДНКЖ-PO<sub>4</sub> – динитрозильные комплексы железа с ацетилцистеиновыми лигандами/глутатионовыми лигандами / фосфатными лигандами,  
AS – Angeli's Salt, соль Ангели,  
CoQ – коэнзим Q, убихинон,  
CoQ-H<sub>2</sub> – восстановленная форма коэнзима Q, убихинол,  
DEPMPO – 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид,  
DMSO – диметилсульфоксид,  
FAD – флавинадениндинуклеотид,  
GSH – восстановленный глутатион,  
GSNO – нитрозоглутатион,  
RSNO – S-нитрозотиол,

PSNO – S-нитрозилированный белок,  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода,  
Hb – гемоглобин,  
HNO – нитроксил,  
LA – липоевая кислота,  
LIP – пул лабильного железа,  
MG – метилглиоксаль,  
NAD(P)H – никотинамидаденин динуклеотид(фосфат),  
NAD<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид  
NO – оксид азота,  
NO<sup>-</sup> – нитроксильный анион,  
NO<sup>+</sup> – нитрозильный катион, нитрозоний,  
NOS – NO-синтаза,  
O<sub>2</sub> – молекулярный кислород,  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксид,  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – синглетный кислород,  
•OH – гидроксильный радикал,  
OONO<sup>-</sup> – пероксинитрит,  
PAPA/NONO – 3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин,  
PA – Piloty's Acid, кислота Пилоти,  
*t*-BOOH – гидропероксид *трет*-бутила,  
TIRON – 4,5-диоксибензол-1,3-дисульфонат натрия,  
NEM – N-этилмалеимид.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Оксид азота (NO) – липофильная молекула, образующаяся в ферментативных и неферментативных реакциях. NO благодаря взаимодействию с гемовыми и негемовыми железосодержащими центрами белков проявляет сигнальные функции, регулируя многие физиологические процессы. Также NO непосредственно реагирует со свободными радикалами, что может иметь как про-, так и антиоксидантный эффект.

NO в организме может существовать в виде различных биологически активных метаболитов, среди которых можно выделить динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) и нитроксил (HNO). ДНКЖ являются физиологической формой депонирования и транспорта NO в живых организмах. ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ) характеризуются формулой  $[(RS^-)_2-Fe^{2+}-(NO)(NO^+)]$ , в которой нитрозильные лиганды представлены молекулами NO и катионами нитрозония (NO<sup>+</sup>) в равных пропорциях [Vanin, 2021]. ДНКЖ могут быть связаны как с низкомолекулярными соединениями, так и с белками. Чаще всего лигандами этих комплексов являются глутатион и цистеин, а при связи с белками – аминокислотные остатки цистеина и гистидина.

RS-ДНКЖ оказывают мощное вазодилататорное и гипотензивное действие, протекторное действие на миокард при экспериментальном инфаркте миокарда, протекторное действие при геморрагическом шоке, пенис-эректильное действие, а также повышают эластичность эритроцитов и ускоряют заживление кожных ран [Ванин, 2015]. Уже разработан и прошел клинические испытания гипотензивный препарат «Оксаком», фармакологической основой которого является биядерный ДНКЖ с глутатионом [Chazov et al., 2012; Родненков с соавт., 2016].

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена их способностью выступать в биосистемах в качестве доноров NO и NO<sup>+</sup>,

которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов [Vanin, 2022]. Включение этих малых сигнальных молекул в ДНКЖ обеспечивает их стабилизацию и транспорт в тканях без самопроизвольного высвобождения. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать NO и NO<sup>+</sup> на гем- и тиолсодержащие белки.

В процессе формирования ДНКЖ образуется протонированная форма нитроксильного аниона (NO<sup>-</sup>) – нитроксил (HNO). В биологических системах нитроксил может образовываться и в других реакциях восстановления NO. Этот метаболит NO обладает высокой биологической активностью, во многом перекрывающейся с действием NO или ONOO<sup>-</sup>. На практике вместо нитроксила используют его доноры, поскольку нитроксил имеет короткое время жизни из-за быстрой димеризации в гипонитритную кислоту.

Наиболее часто используемые доноры HNO(NO<sup>-</sup>) – соль Ангели (триоксодинитрат натрия, Na<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и кислота Пилоти (N-гидроксибензолсульфонамид). Эти соединения хорошо себя зарекомендовали в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, алкоголизма и рака [Fukuto, 2019]. Особенно перспективно их использование в качестве кардиопротекторных средств, поскольку они обладают гипотензивным действием, а также способны улучшать сократимость миокарда и ингибировать его гипертрофию [Flores-Santana et al., 2011; Andrews et al., 2015; Keceli et al., 2019].

Химические свойства NO и HNO позволяют также рассматривать эти молекулы и в качестве антиоксидантов. В нашей лаборатории проводятся исследования антиоксидантного и прооксидантного действия ДНКЖ с различными физиологическими лигандами. Необходимость в таких исследованиях обусловлена тем, что ДНКЖ содержат ионы Fe<sup>2+</sup>, которые являются мощным катализатором образования свободных радикалов. В связи с этим необходимо продолжить изучение антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ и HNO в различных экспериментальных системах.



Поскольку окислительный стресс тесно связан с карбонильным [Baynes, 1991; Yim et al., 1995; Kosmachevskaya et al., 2014; Nakamura, Kawaharada, 2021; Shumaev et al., 2009, 2023], то вещества с антиоксидантными и антирадикальными свойствами могут препятствовать протеканию реакций неферментативного гликирования биомолекул. Было показано, что ДНКЖ с тиоловыми лигандами обладают таким действием [Shumaev et al., 2023]. Возможно, что и нитроксил может выступать в роли ингибитора образования конечных продуктов гликирования (КПГ). Поэтому представляется актуальным изучение действия доноров нитроксила на модификацию белков окислением и гликированием.

### **Цель и задачи исследования**

Целью работы является изучение влияния метаболитов оксида азота (динитрозильных комплексов железа и нитроксильного аниона) на свободнорадикальную модификацию белков и липидов в условиях, моделирующих окислительный и карбонильный стресс.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить антирадикальное и антиоксидантное действие ДНКЖ с различными лигандами в гидрофобных и гидрофильных системах, моделирующих свободнорадикальное окисление.
- 2) Изучить процесс образования ДНКЖ в митохондриях, а также понять роль нитроксила в регенерации этих комплексов.
- 3) Изучить антиоксидантное действие нитроксила в системе, моделирующей окисление гемоглобина.
- 4) Изучить антигликирующее действие нитроксила в системах, моделирующих карбонильный стресс.

### **Научная новизна работы**

Получены новые данные о влиянии физиологических метаболитов оксида азота, ДНКЖ и нитроксила, на процессы свободнорадикального окисления липидов и окислительной модификации белков. Показано, что благодаря антиоксидантному и антирадикальному действию нитроксил

замедляет реакции неферментативного гликирования белков. Зарегистрировано образование ДНКЖ, связанных с железосодержащими белками, при воздействии на митохондрии активными формами кислорода и азота. Впервые показано, что нитроксил способен участвовать в регенерации альфа-токоферола, а также в образовании и регенерации динитрозильных комплексов железа.

### **Научно-практическая значимость работы**

В настоящее время доноры NO и доноры нитроксила рассматривают в качестве потенциальных фармакологических агентов с широким спектром действия. Эти соединения хорошо себя зарекомендовали в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. В отличие от органических нитратов, традиционно используемых в медицине в качестве вазодилататоров, применение ДНКЖ и доноров нитроксила не приводит к возникновению толерантности к этим соединениям. В диссертационной работе показано, что эти метаболиты NO проявляют антиоксидантное и антирадикальное действие в различных белковых и липидных системах. Благодаря этому они также могут оказывать антигликирующее действие.

Сочетание в ДНКЖ и нитроксилах кардио- и вазопротекторных свойств с антиоксидантными и антигликирующими может послужить основой для разработки фармакологических препаратов, обладающих синергетическим терапевтическим действием, которые будут эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при карбонильном стрессе. Полученные результаты позволяют расширить область применения ДНКЖ и доноров нитроксила.

Полученные данные также могут помочь в понимании механизмов патологических состояний, связанных с гипергликемией, часто сопровождающейся усилением свободнорадикальных процессов в клетках и тканях.

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

- 1) ДНКЖ с глутатионовыми лигандами в модельных липид-содержащих (гидрофобных) и белок-содержащих (гидрофильных) системах ингибируют свободнорадикальное окисление за счет перехватывания активных форм кислорода и азота.
- 2) В митохондриях при воздействии на них активными формами кислорода и азота образуются ДНКЖ, связанные с железосодержащими белками.
- 3) Нитроксил участвует в образовании и регенерации ДНКЖ и  $\alpha$ -токоферола – основного липофильного антиоксиданта.
- 4) Нитроксил действует как антиоксидант и антигликирующий агент в экспериментальных системах с метилглиоксалем, моделирующих окислительный и карбонильный стресс.

**Личный вклад диссертанта.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, их обработку, оформление и публикацию результатов.

**Связь с государственными программами.** Работа выполнялась в рамках государственного задания по темам «Влияние активных метаболитов оксида азота и редокс-активных интермедиатов карбонильного стресса на функционирование гемоглобинов» и «Роль биологически активных метаболитов и факторов стресса в функционировании, адаптации и эволюции живых систем» и была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 18-34-00561 мол\_а и № 19-015-00444а).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 8 тезисов и 8 статей, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: X международная конференция «Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine» (Краков, Польша, 2016); XXV съезд по спектроскопии (Троицк, Москва, 2016); Международная научная конференция двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, Беларусь, 2016); Научная неделя молодых ученых и специалистов в области биологических наук (Петрозаводск, Карелия, 2017); IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи-Дагомыс, 2019); XXVII и XXX международные конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Крым, 2019, 2022); юбилейная научно-практическая конференция: «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра» (Сухум, Абхазия, 2022).

**Структура и объем работы.** Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 186 страницах текста, иллюстрирована 45 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 352 источника.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Свободные радикалы и окислительный стресс

#### 1.1.1. Свободные радикалы и их роль

Свободными радикалами называют молекулы или структурные фрагменты молекул, имеющие, на внешней орбитали неспаренный электрон. Поскольку для стабильного состояния молекуле необходимо иметь на наружной орбитали два электрона, то свободные радикалы активно стремятся отнять недостающий электрон от других молекул. Благодаря этому они имеют высокую реакционную способность [Ланкин с соавт., 2000].

Активные формы кислорода в живых системах производятся постоянно. Согласно одной из классификаций свободные радикалы, образующиеся *in vivo*, можно разделить на три группы: первичные, вторичные и третичные. Первичные (супероксид, семихиноны,  $\text{NO}^\bullet$  и др.) образуются при участии ферментов (дыхательная цепь митохондрий, ферментативные системы клеток) и имеют физиологическое значение в организме. Вторичные радикалы ( $^\bullet\text{OH}$ , липидные радикалы:  $\text{L}^\bullet$ ,  $\text{LO}^\bullet$ ,  $\text{LOO}^\bullet$  и др.) обычно являются побочным результатом взаимодействия кислорода с различными редокс-активными соединениями в клетках, такими как  $\text{H}_2\text{O}_2$ , пероксинитрит ( $\text{OONO}^-$ ), гидропероксиды липидов ( $\text{LOOH}$ ) и др. Третичные радикалы генерируются главным образом в результате взаимодействия вторичных радикалов с антиоксидантами-ловушками ( $\alpha$ -токоферол, аскорбат, коэнзим Q и др.). Именно вторичные радикалы являются самой распространенной мишенью для антиоксидантов, разрабатываемых различными исследователями [Forman, 2021].

Свободные радикалы кислорода, а также другие активные формы кислорода и азота проявляют цитотоксическое действие, связанное с их высокой химической активностью и способностью вызывать деструкцию или модификацию различных биологических молекул и клеточных структур

[Halliwell, Gutteridge, 2015; Меньщикова с соавт., 2006; Murphy, 2009]. В гидрофобной фазе свободные радикалы инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Griffiths, 2005; Lankin, 2022].

К наиболее важным активным формам кислорода (АФК) следует отнести супероксидный радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), гидроксильный радикал ( $\bullet OH$ ) и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), также, иногда, к АФК относят  $ONOO^-$ .

### *Супероксид анион-радикал*

Предшественником АФК считается супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) или как его еще называют, супероксидный радикал или супероксид. Он образуется в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. В живых системах существует несколько основных путей генерации супероксида: ферментативный процесс в фагоцитирующих клетках, запускающийся при активации лейкоцита; окисление ксантина кислородом до мочевой кислоты, катализируемое ксантиноксидазой; электрон транспортная цепь митохондрий.

Известно, что при нормальном функционировании митохондрий около 2% кислорода восстанавливается до супероксида в результате прямого взаимодействия кислорода с молекулами-переносчиками дыхательной цепи [Ланкин с соавт., 2000].

Из-за высокой активности, время жизни супероксида в биологических системах очень мало – около  $10^{-6}$  секунды [Владимиров с соавт., 1991]. Важной реакцией супероксида, является реакция его протонирования:



Также в реакции спонтанной дисмутации супероксида образуются такие АФК как  $H_2O_2$  и синглетный кислород:



Дисмутация супероксида может катализироваться различными изоформами супероксиддисмутазы (СОД). При физиологических рН

константа скорости спонтанной дисмутации супероксида составляет  $4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , тогда как в присутствии СОД скорость реакции дисмутации возрастает до  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  без образования синглетного кислорода [Меньщикова с соавт., 2006]. Если по некоторым оценкам внутриклеточная концентрация  $\text{O}_2^{\bullet-}$  составляет  $\sim 10^{-10} \text{ M}$ , то стационарная концентрация продукта реакции дисмутации – пероксида водорода, в митохондриях составляет  $\sim 5 \times 10^{-10} \text{ M}$  [Auchère, 2002].

Супероксид в физиологических условиях проявляет свойства как окислителя так и восстановителя. Несмотря на низкий редокс потенциал пары  $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{O}_2$  (-0,33 В) супероксид может выступать как окислитель различных биологических молекул. Многие низкомолекулярные соединения, в том числе  $\alpha$ -токоферол, аскорбат и тиолы, полифенолы, катехоламины эффективно реагируют с  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , образуя в качестве продуктов свободнорадикальные соединения [Auchère, 2002; Меньщикова с соавт., 2006]. Поскольку супероксид, в отличие от  $\text{HO}_2^{\bullet}$ , не способен проникать через биологические мембраны, то его вклад в процессы ПОЛ незначителен [Griffiths, 2005].

### ***Синглетный кислород***

Синглетный кислород образуется при изменении спина одного из электронов, находящегося на  $\pi^*$ -орбиталях молекулы кислорода. Энергия возбужденного синглетного состояния превосходит энергию триплетного. Синглетный кислород также может продуцироваться в результате реакции спонтанного диспропорционирования супероксида, в реакции Хабера-Вайса, а также при взаимодействии гидроксильного радикала с супероксидом [Меньщикова с соавт., 2006]:



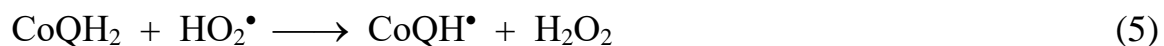
При взаимодействии гипохлорита с перекисью водорода также наблюдается высокий уровень продукции синглетного кислорода [Stief, 2003]:



Еще одним механизмом образования  $^1\text{O}_2$  является фотосенсебилизация – процесс, при котором с возбужденной молекулы сенсебилизатора энергия переносится на молекулярный кислород, превращая его в  $^1\text{O}_2$ . В растениях и фотосинтезирующих микроорганизмах таким фотосенсебилизатором является, например, хлорофилл [Красновский, 1994].

### *Пероксид водорода и гидроксильный радикал*

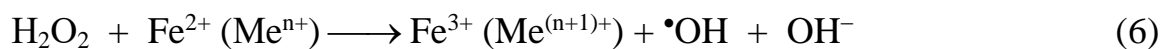
Пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и гидроксильный радикал ( $\bullet\text{OH}$ ), как и  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , являются промежуточными продуктами восстановления молекулы кислорода до воды. При переносе двух электронов на  $\text{O}_2$  или одного электрона на  $\text{O}_2^{\bullet-}$  образуется дианион  $\text{O}_2^{2-}$ , который, затем, протонируется до  $\text{H}_2\text{O}_2$  при физиологических значениях pH. Поскольку молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  не заряжена, она способна преодолевать относительно большие расстояния. За счет своей полярности  $\text{H}_2\text{O}_2$  легко проникает сквозь липидную мембрану, достигая различных компартментов клетки и оказывая в них разрушительное воздействие на биомолекулы [Farre, 2001]. В эукариотических клетках большая часть  $\text{H}_2\text{O}_2$  генерируется в пероксисомах. В этих органеллах находятся ферменты, продуцирующие пероксид водорода. В матриксе митохондрий  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется из супероксида при участии Mn-содержащей СОД [Brand 2020]. Кроме того, перекись водорода является продуктом реакции гидроперекисного радикала с восстановленной формой убихинона [James et al., 2005]:



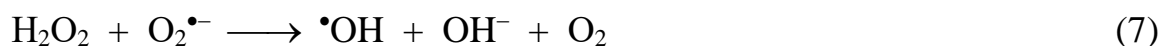
Помимо собственной токсичности пероксид водорода также является предшественником наиболее реакционноспособной формы АФК – гидроксильного радикала. Он образуется в реакции одноэлектронного восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В живых системах роль восстановителей чаще всего выполняют ионы металлов переменной валентности –  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и др. Часто катионы  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  ассоциированы с отрицательно заряженными молекулами (ДНК, мембраны, некоторые белки), поэтому  $\bullet\text{OH}$



образуются вблизи с этими биологически важными соединениями. Впервые реакцию образования гидроксильного радикала при участии  $\text{Fe}^{2+}$  описал химик Генри Джон Хорстман Фентон в конце XIX века [Fenton, 1894]:



Реакция между супероксидом и  $\text{H}_2\text{O}_2$  известна как реакция Хабера-Вайса:



В физиологических условиях константа скорости этой реакции менее 1, но в присутствии низких концентраций ионов железа скорость реакции возрастает более, чем в 10000 раз. В результате, при физиологических значениях pH, реакция Хабера-Вайса представляет собой сочетание реакции Фентона и одноэлектронного восстановления ионов  $\text{Fe}^{3+}$  супероксидным радикалом [Goldstein, 1993]:



В живых системах редокс цикл ионов железа, необходимый для генерации  $\cdot\text{OH}$ , может поддерживаться благодаря восстановлению  $\text{Fe}^{3+}$  аскорбатом, глутатионом, цистеином и другими эндогенными восстановителями [Шумаев, 2010].

Также одним из важных источников гидроксильного радикала является гомолиз пероксиазотистой кислоты ( $\text{HOONO}$ ) в соответствии с реакцией [Beckman et al., 1990]:



Также, взаимодействие гидроксильных радикалов с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) играет значительную роль в инициации цепных реакций ПОЛ в биологических мембранах.



### ***Пероксинитрит***

Пероксинитрит может образовываться в диффузионно-контролируемой реакции супероксида с оксидом азота [Pacher et al., 2007]:



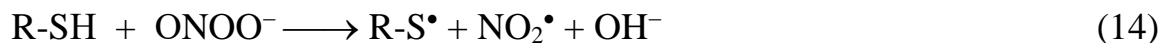
Важно, что скорость этой реакции ( $k = 4,3 - 19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) как минимум в 2 раза превышает скорость взаимодействия супероксида с СОД ( $k \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Если продукция NO и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  пространственно сближена, то вероятность образования  $\text{ONOO}^-$  особенно высока. Так, например, происходит в фагоцитирующих клетках при окислительном взрыве и в митохондриях. Также известно, что одна из разновидностей NO-синтаз (индуцибельная NO-синтаза макрофагов) может, наряду с основным продуктом (NO), генерировать супероксид.

Также, пероксинитрит образуется в результате реакции нитроксильного аниона с кислородом ( $k \sim 5,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Trujillo et al., 2000]:



В присутствии кислорода примерно 65%  $\text{NO}^-$ , образующегося из соли Ангели, превращается в пероксинитрит [Kirsch, Groot, 2002]. Молекулы, образующиеся при распаде пероксинитрита, стимулирует ПОЛ и разрушение мембран, вызывают окислительную деструкцию ДНК и белков, что делает это соединение чрезвычайно цитотоксичным. Также пероксинитрит в 400 раз эффективнее проникает через фосфолипидную мембрану, нежели супероксид. Коэффициент проницаемости для  $\text{ONOO}^-$  составляет примерно  $8,0 \times 10^{-4} \text{ см/с}$  [Pacher et al., 2007].

Основной мишенью действия  $\text{ONOO}^-$  в биологических системах являются SH-группы низкомолекулярных тиолов и белков ( $k = 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). В реакции  $\text{ONOO}^-$  с R-SH образуется тиильный радикала (R-S $\bullet$ ):



Со способностью пероксинитрита окислять тиоловые группы связан один из путей образования S-нитрозотиолов [Griffiths, 2005]. Например, образование GS-NO может происходить следующим образом:



Существует еще один механизм *S*-нитрозилирования, связанный с прямой реакцией пероксиазотистой кислоты с тиолят-анионом [van der Vliet et al., 1998]:



### 1.1.2. Перекисное окисление липидов, образование радикалов липидов

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) происходят у всех аэробных организмов преимущественно в биомембранах и других липидных и липид-белковых структурах.

Перекисное окисление органических соединений представляет собой окисление молекулы путем присоединения к ней кислорода с образованием перекисной группы {–O–O–}, при этом могут образовываться гидропероксиды (ROOH) и органические пероксиды (ROOR). Чаще всего процессы перекисного окисления происходят под действием свободных радикалов. Продукты реакций перекисного окисления могут играть и положительную роль, например, пероксиды ПНЖК являются необходимыми интермедиатами для ферментативных реакций образования стероидных гормонов, простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [Wink, Mitchell, 1998; Ланкин с соавт., 2001; Stocker, Keaney, 2004]. Ферментативные системы также участвуют в образовании липидных гидропероксидов в биологических системах. Например, продуцирование липопероксидов в различных организмах осуществляют липоксигеназы, циклооксигеназы и NADPH-зависимые микросомальные оксигеназы. Окисление липидов может играть и положительную роль, например, в митохондриях окисление кардиолипина (основного липида мембран) запускает апоптоз [Shadyro et al., 2019].

Б.Н. Тарусов и Н.М. Эмануэль установили, что кинетика перекисного окисления органических соединений соответствует механизму разветвленных и вырожденно-разветвленных реакций, в ходе которых ненасыщенные ацилы липидов окисляются до короткоцепочечных фрагментов [Тарусов, 1962]. Н.Н. Семёнов произвел тщательный анализ кинетики ПОЛ и описал три типа

цепных реакций перекисного окисления [Семенов, 1986]. Первый тип – неразветвленные реакции, когда в ходе реакции свободного радикала с молекулой-мишенью образуется один новый радикал (количество радикалов не возрастает). Второй тип – разветвленные реакции, когда в каждом цикле возникают три новых радикала (количество радикалов увеличивается лавинообразно). Третий тип – вырожденно-разветвленные реакции (количество радикалов медленно возрастает из-за периодического распада интермедиатов реакции на два радикала).

Процессы ПОЛ в живых организмах были открыты и изучены раньше, чем оксидазный путь окисления органических субстратов в дыхательной цепи. В 1897 г. А.Н. Бах сформулировал перекисную теорию биологического окисления [Бах, 1897], в настоящее время известную как теория Баха-Энглера. Согласно этой теории гидропероксиды играют ключевую роль в метаболизме как интермедиаты окисления субстратов. Эта идея во многом оказалась провидческой. В большом числе исследований, посвященных свободнорадикальным процессам в норме и при патологиях, доказана важная роль органических гидропероксидов в совокупности с системами их ферментативного генерирования и утилизации в метаболизме биологически активных веществ, регуляции функционирования различных клеточных структур [Владимиров с соавт., 1991; Lankin et al., 2007].

АФК, в первую очередь гидроксильный радикал, а также в меньшей степени супероксид индуцируют реакции перекисного окисления [Laguerre et al., 2007]:

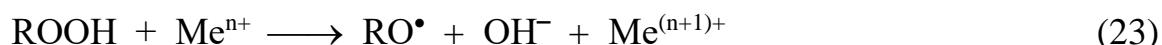


Кроме этого, процессы перекисного окисления могут вызывать внешние физические и химические факторы: ионизирующее излучение, озон, различные ксенобиотики, окислы азота и др. После стадии инициации цепных

реакций перекисного окисления следует продолжение процессов ПОЛ и разветвление цепи реакций [Venkataraman et al., 2004]:



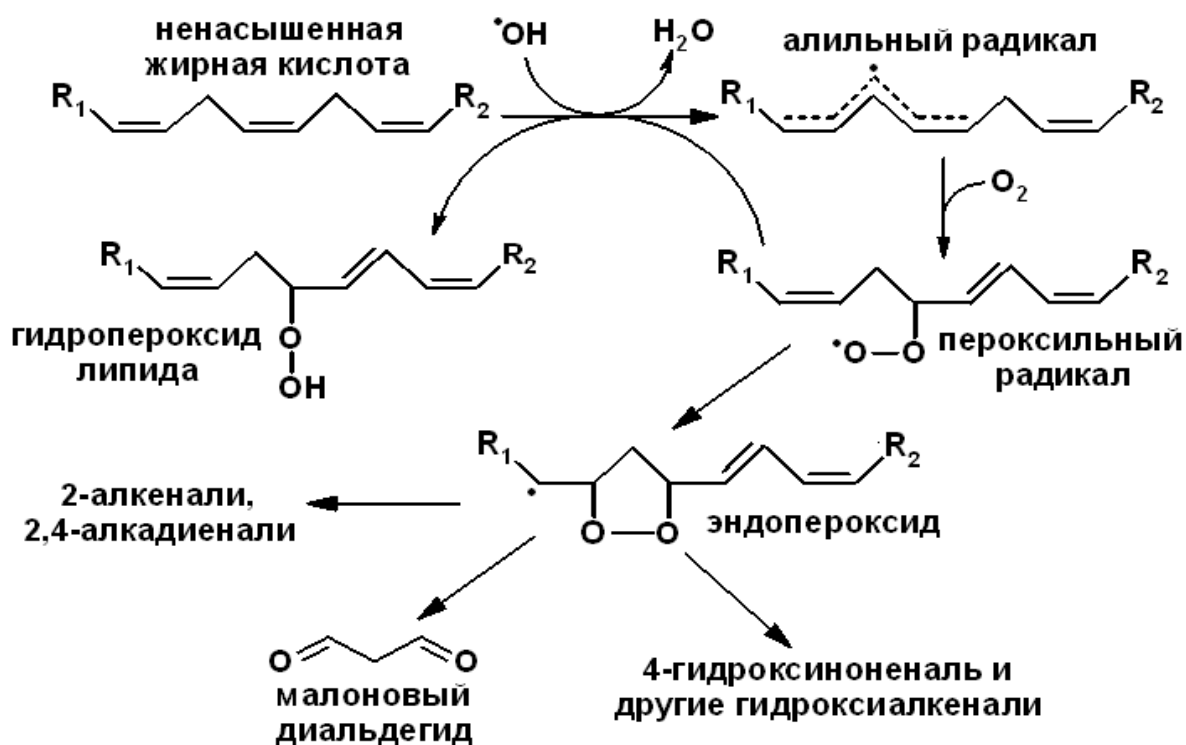
Следующий этап разветвления цепи происходит в реакциях с участием металлов переменной валентности (чаще всего  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ ):



В этих реакциях происходит образование алкоксильных радикалов липидов ( $RO^{\bullet}$ ), пролонгирующих цепные реакции перекисного окисления. Цепные реакции ПОЛ могут также терминироваться в реакциях рекомбинации свободных радикалов друг с другом [Schieber, 2014]:



На рисунке 1.1.1. представлена схема образования первичных (гидропероксиды и эндпероксиды) и вторичных (малоновый диальдегид и другие карбонильные соединения) продуктов свободнорадикального ПОЛ [Zwart et al, 1999]. Первичные продукты являются диеновыми конъюгатами. Из ненасыщенной жирной кислоты образуется алильный радикал, который реагирует с молекулярным кислородом с образованием пероксильного радикала. Этот радикал участвует в пролонгировании цепной реакции ПОЛ. Вместе с тем, свободнорадикальные интермедиаты ПОЛ в последовательных реакциях фрагментации, перегруппировки и окисления могут превращаться в более устойчивые карбонильные соединения, например, МДА.



**Рисунок 1.1.1. Образование первичных и вторичных продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов.**

Также свободнорадикальные интермедиаты могут обрываться при взаимодействии продуктов окисления с некоторыми антиоксидантами: [Бурлакова с соавт., 1998; Laguerre et al., 2007]:



Образующийся радикал ингибитора ( $\text{In}^*$ ) относительно стабилен и не участвует в реакциях ПОЛ. К тому же этот радикал способен восстанавливаться в свою нерадикальную форму.

К реакциям терминации также можно отнести реакции свободных радикалов ингибитора и липида с образованием нерадикального продукта. Такие реакции наиболее характерны для органического пероксильного радикала [Laguerre et al., 2007]:



Если скорость терминации выше, чем скорость развития процесса ПОЛ, то он прекращается. Если разветвление и развитие процессов окисления

опережает реакции терминации, то ПОЛ автокаталитически ускоряется. Это сопровождается ростом концентрации гидропероксидов и других продуктов окисления, и вовлечением в процесс ПОЛ всё большего количества молекул.

## **1.2. Метаболиты оксида азота: образование, свойства, биоактивность**

### **1.2.1. Образование и действие оксида азота в биологических системах**

#### ***Образование оксида азота***

Оксид азота в живых системах образуется ферментом NO-синтазой (*L*-аргинин, NADPH:кислород-оксидоредуктаза КФ 1.14.13.39), который катализирует реакцию превращения *L*-аргинина в *L*-цитруллин. В организме имеется несколько изоформ NO-синтаз (NOS): нейрональная (nNOS), митохондриальная (mtNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS) [Alderton et al., 2001]. Все эти изоформы являются гемопротеидами, состоящими из двух одинаковых субъединиц, имеющих молекулярный вес ~110-160 кДа. Каждый мономер NOS содержит два домена: N-концевой оксидазный и C-концевой редуктазный. Редуктазный домен всех NO-синтаз содержит сайты для связывания NADP, FMN, FAD. Редуктазный домен имеет также кальмодулин-связывающий участок, а оксидазный домен – гемовую группу и сайты связывания тетрагидробиоптерина и *L*-аргинина [Groves, Wang, 2000].

Изоформы NOS, постоянно присутствующие в клетках и тканях, – nNOS, eNOS и mtNOS требуют для своей активации наличие кофактора –  $Ca^{2+}$ , который поступает при связывании с белком кальмодулином.  $Ca^{2+}$  обеспечивает переход электронов между доменами NO-синтазы [Alderton et al., 2001]. Напротив, индуцибельная NOS не нуждается в ионах  $Ca^{2+}$  для своей активации, т.к. кальмодулин жестко связан с этим ферментом, тем самым обеспечивая его постоянное функционирование [Ricciardolo et al., 2004]. Индуцибельная NOS может стабильно продуцировать NO в микромолярных концентрациях. При этом высокие концентрации NO могут ингибировать

фермент по механизму отрицательной обратной связи. Например, в этом механизме может быть задействован пероксинитрит, окисляющий Zn-тиольный кластер в оксидазном домене фермента, тем самым снижая его активность.

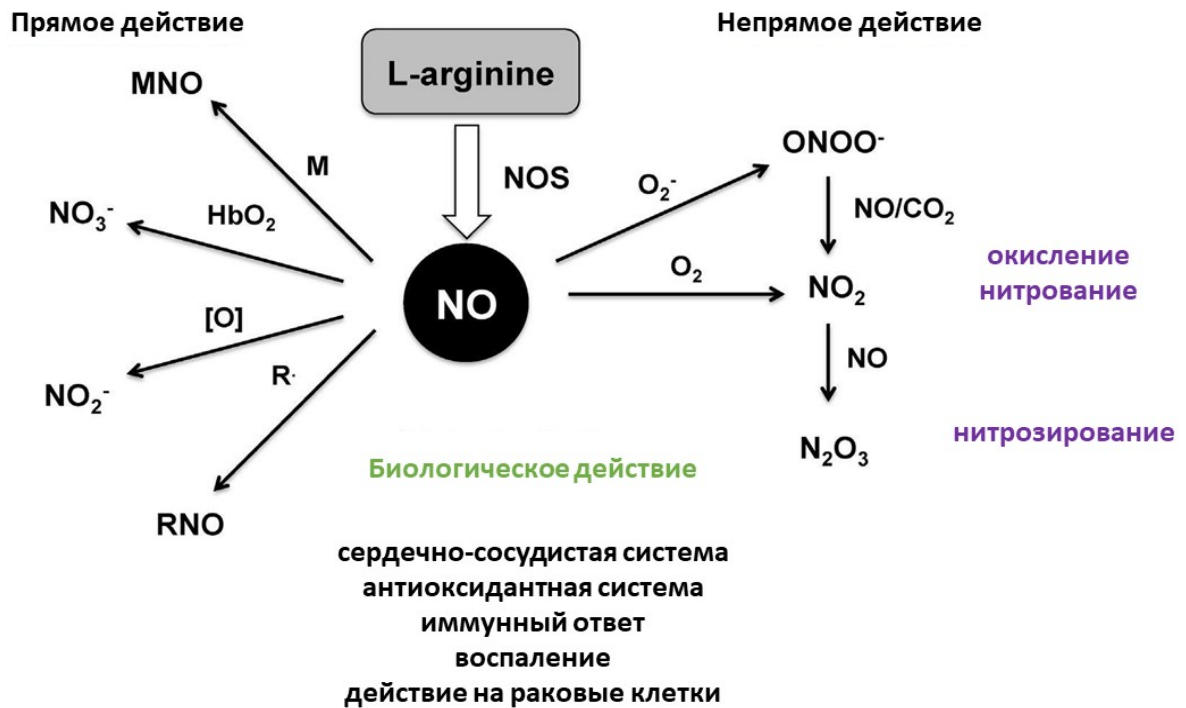
Помимо функционирования NOS существуют и другие пути синтеза NO: нитритредуктазная реакция, катализируемая ферментами электрон транспортной цепи митохондрий и дезоксигенированным гемоглобином в эритроцитах при гипоксии [Huang et al., 2005]; восстановление нитрит-аниона эндогенными восстановителями, например, витамином С и низкомолекулярными тиолами [Микоян с соавт., 2006]. В условиях гипоксии реакция восстановления нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) может стать альтернативным, независимым от кислорода источником небольшого количества NO [Реутов с соавт., 1998].

### ***Прямое и опосредованное действие оксида азота***

В 1990-х годах была разработана одна из концепций, описывающих принцип действия NO в живых системах [Wink, Mitchell, 1998], основу которой составляли два различных типа реакций (прямые и опосредованные) в зависимости от концентрации NO, его мишеней и кинетики реакций (рисунок 1.2.1.).

Прямое действие связано с взаимодействием самой молекулы NO с биологическими мишенями. Эти реакции в основном включают гемовые белки и некоторые виды радикалов. Наиболее важным примером прямого действия является взаимодействие NO с растворимой гуанилатциклазой, что приводит к большинству физиологических эффектов NO через образование цГМФ из ГТФ [Moncada et al., 1991].





**Рисунок 1.2.1. Прямые и опосредованные реакции NO в живых системах.**

NO может взаимодействовать с рядом других гемсодержащих белков, включая гемоглобин, циклооксигеназу, цитохром P450 и цитохром-с оксидазу. NO может либо связываться непосредственно с железным центром, либо взаимодействовать с другими связанными лигандами. Например, реакция NO с оксигемоглобином приводит к образованию нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ) и метгемоглобина [Космачевская с соавт., 2019]. Действие NO на биологические мишени во многом определяется его концентрацией. Например,  $K_{eq} \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$  для растворимой гуанилатциклазы указывает на то, что для активации этого пути требуется концентрация NO 1-10 нМ. С другой стороны, для белков, содержащих  $\text{Fe}^{3+}$ , например, циклооксигеназы-2,  $K_{eq} \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ . И для образования стабильного комплекса требуется концентрация NO порядка 0,1 мМ, которой нелегко достичь в условиях *in vivo* [Flores-Santana et al., 2009]. Для взаимодействия с некоторыми видами радикалов требуются совсем низкие концентрации NO.

В высоких концентрациях NO взаимодействует с металлсодержащими центрами или приводит к образованию активных форм азота (АФА). Такие

процессы составляют основу антипатогенных и противоопухолевых реакций иммунной системы организма [Ridnour et al., 2004].

Образование  $\text{NO}_2$  и  $\text{N}_2\text{O}_3$  может привести к окислению/нитрованию белков и липидов. Нитрозирование белковых тиолов приводит к образованию тионитритов, что может ингибировать ферментативную функцию, а также активировать ключевые сигнальные пути в нормальных и патофизиологических условиях [Lima et al., 2010].

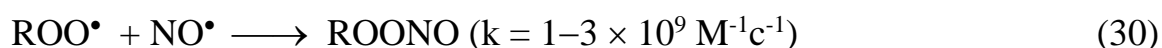
### *Антиоксидантное и прооксидантное действие оксида азота*

NO является стабильным незаряженным радикалом, функции которого зависят от концентрации в биологических средах. В наномолярных концентрациях NO, образуемое конститутивной, эндотелиальной и нейрональной NOS, выполняет биорегуляторную функцию. Микромолярные уровни NO генерируются индуцибельной NOS во время иммунного ответа. Основными биомишенями NO являются радикалы, редокс-активные центры металлов и  $\text{O}_2$  [Toledo, Augusto, 2012; Wink, Mitchell, 1998]. Скорость потребления NO зависит от доступности и реактивности его биологических мишеней, поэтому в разных компартментах клетки она различна. Если скорости реакций NO с  $\text{O}_2$  описывается кинетикой третьего порядка (второго порядка по NO), то реакции с радикалами близки к диффузионно-контролируемым скоростям.

NO хорошо растворим как в водной ( $1,9 \text{ mM atm}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$ ), так и в гидрофобной (почти в 10 раз выше) среде. Поэтому мембраны не являются барьерами, и NO может свободно диффундировать через клетки. В мембранах NO может действовать как антиоксидант, реагируя с радикалами липидов и белков [Lam et al., 2008], обрывая радикально-цепные реакции, тогда как реакция NO с супероксидным радикалом ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) приводит к образованию  $\text{ONOO}^-$  [Huie, Padmaja, 1993], сильного окислителя, вызывающего окисление, нитрование и нитрозирование биомолекул [Peixoto et al., 2018; Ford, Miranda, 2020].

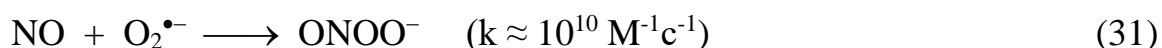
Антиоксидантное действие большинства антиоксидантов реализуют двумя путями. Согласно первому пути, антиоксидант восстанавливает радикал, при этом образуется радикальная форма антиоксиданта, которая менее цитотоксична нежели первичный радикал. Вторым путем заключается в том, что антиоксидант и радикал, реагируя, образуют продукт, который не обладает высокой активностью.

В различных экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было доказано, что NO может действовать как антиоксидант, вступая в реакцию с радикалами ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $Tyr^{\bullet}$ ,  $RS^{\bullet}$ ,  $\bullet NO_2$ ,  $ROO^{\bullet}$ ). Оксид азота за счет образования нитрозированных и нитрованных липидов в реакции с  $ROO^{\bullet}$  обрывает цепные реакции ПОЛ [Padmaja, Huie, 1993]:

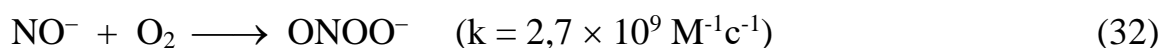


Следует отметить, что нитропроизводные липидов обладают биологической активностью [Trostchansky, Rubbo, 2008].

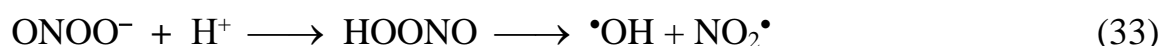
Однако NO может действовать и как прооксидант, являясь источником активных форм азота. Наиболее цитотоксичным физиологическим производным NO является  $ONOO^-$ , который образуется в диффузно-контролируемой реакции NO с супероксидом [Beckman, Koppenol, 1996]:



Пероксинитрит также может образовываться в реакции триплетного нитроксильного аниона с молекулярным кислородом [Fukuto et al., 2005]:



Токсические свойства  $ONOO^-$  в значительной степени определяются образующимися при его распаде гидроксильным радикалом и диоксидом азота:



Известно, что продукция пероксинитрита усиливается при многих патологических состояниях (воспалении, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях) [Pacher et al., 2007]. В крови источником

пероксинитрита являются клетки иммунной системы макрофаги, которые в ответ на вторжение патогенных микроорганизмов производят его в больших количествах.

Оксид азота с помощью свободной диффузии проникает в эритроциты, в которых взаимодействует с гемоглобином. Это взаимодействие конкурирует с реакцией NO и  $O_2^{\bullet-}$  [Prolo et al., 2015]. Однако супероксид может образовываться и в самих эритроцитах. Это может происходить в условиях гипоксии, когда при низком  $pO_2$  гемоглобин (Hb) активно отдает кислород. Предрасположенность к автоокислению также обнаруживают абберантные формы гемоглобина [Prus et al., 2010]. Оксид азота может продуцироваться в эритроцитах в реакции восстановления нитрит-ионов deoxyHb [Huang et al., 2005; Patel et al., 2011].

### 1.2.1. Нитрозотиолы

*S*-нитрозотиолы возникают в результате реакции сульфгидрильных групп с активными формами азота (реакции 16 и 17). Достаточно часто нитрозотиолы образуются на цистеиновых остатках белков [Foster, Stamler, 2004]. При физиологических значениях pH реакция NO с SH-группами не приводит к образованию *S*-нитрозотиолов. Нитрозотиолы образуются в кислой среде, согласно следующей реакции:



Имеются также данные, что в образовании этих соединений участвуют динитрозильные комплексы железа [Vanin, 2009].

При распаде нитрозотиолов образуется оксид азота и тиольные радикалы, в результате рекомбинации которых образуется дисульфид. Суммарная реакция для *S*-нитрозоглутатиона выглядит следующим образом:



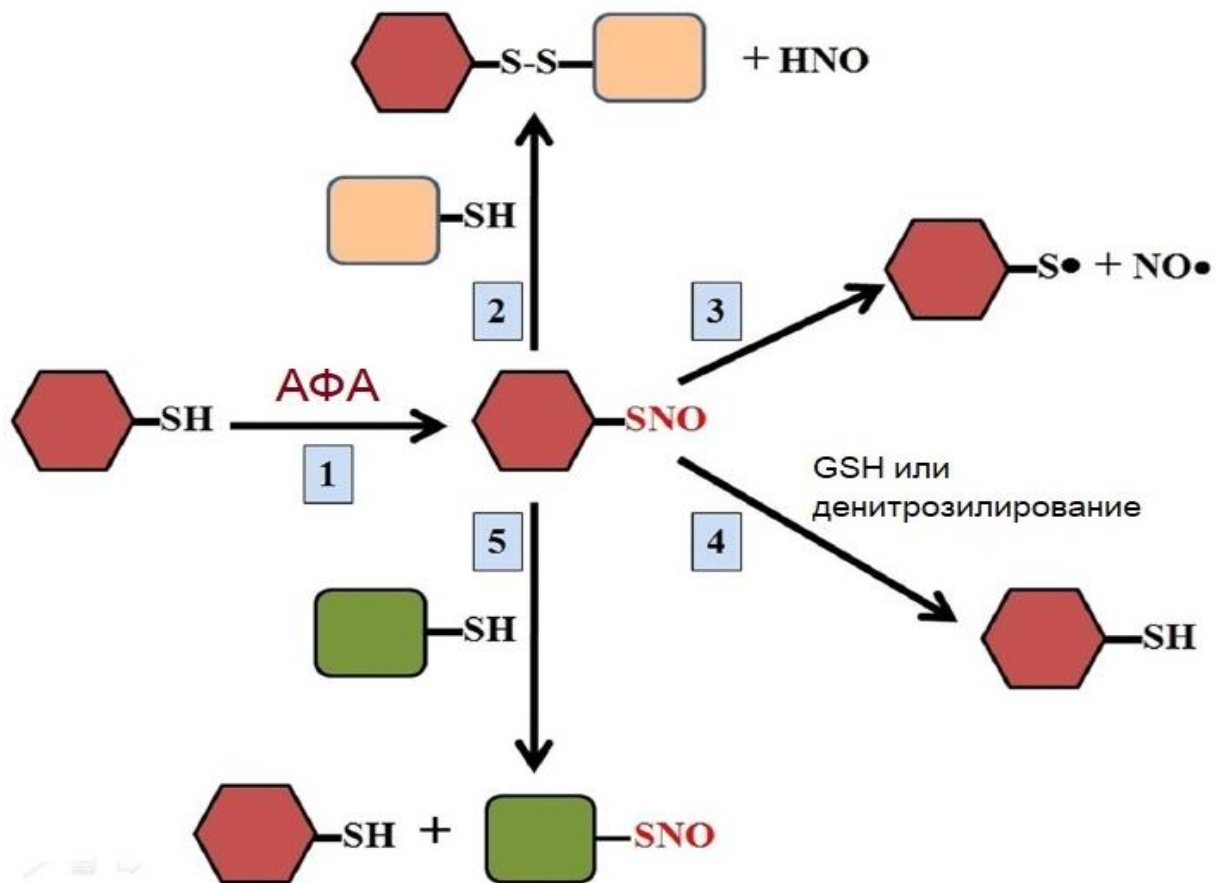
*S*-нитрозотиолы играют важную роль для регуляции физиологических процессов в организме человека и животных. Они продуцируют оксид азота, оказывающий иммуномодулирующее и вазодилататорное действие.

На сегодняшний день было идентифицировано огромное количество цистеинсодержащих белков, которые посредством обратимой посттрансляционной модификации *S*-нитрозилированием участвуют в передаче сигнала NO для регулирования различных клеточных процессов. Эта модификация оказывает как положительное, так и отрицательное воздействие на функционирование белков. Примерами положительного воздействия являются сердечно-сосудистая сигнализация,  $Ca^{2+}$ -зависимая активация ионных каналов, расслабление гладкой мускулатуры, вазодилатация эндотелия и нейротрансмиссия [Lima et al., 2010]. Чрезмерные уровни *S*-нитрозилирования вредны для клетки и приводят к патологическим состояниям в организме, таким как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и другие расстройства центральной нервной системы [Chamorro et al., 2016]. Большое внимание исследователей обращено на роль *S*-нитрозилирования ключевых белков, участвующих в развитии различных видов рака, включая рак поджелудочной железы, рак яичников и рак молочной железы [Mishra et al., 2020].

Для того чтобы оказывать сигнально-регуляторное действие *S*-нитрозотиолы должны быть достаточно стабильными соединениями. Однако стабильность *S*-нитрозотиолов (RSNO) и *S*-нитрозилированных белков (PSNO) в клетке ставится под сомнение. Существует точка зрения, согласно которой PSNO являются временными предшественниками в образовании более стабильных дисульфидных связей, которые являются функциональными эффекторами в клетках. *S*-нитрозилирование по сути является фундаментальной посттрансляционной модификацией, подобной фосфорилированию, которая контролируется нитрозилазами, аналогичными киназам, и денитрозилазами, аналогичными фосфатазам. Данные ферменты поддерживают стационарный гомеостаз PSNO в клетке. В свою очередь, PSNO могут за счет реакции транс-*S*-нитрозилирования других тиолсодержащих белков распространять сигнальное действие NO [Kovacs et al., 2013].

На рисунке 1.2.2. представлены пути образования и превращения нитрозотиолов в клетке. Нитрозилированные белки действительно образуются в клетке в условиях нитрозативного стресса. Например, *S*-нитрозилированный белок PARKIN был обнаружен в значительных количествах в головном мозге пациентов с болезнью Паркинсона, что препятствовало проявлению защитного действия убиквитин-лигазы и способствовало прогрессированию болезни. Также *S*-нитрозилирование белка SP-D (легочного сурфактанта) изменяет четвертичную структуру белка, который постепенно становится хемоаттрактором для макрофагов и клеток врожденного иммунитета [Guo et al., 2019]. Кроме этого, *S*-нитрозилирование некоторых белков наделяет их антигенной активностью, что активировало иммунный ответ и выработку антител [Khan et al., 2014]. Эти факты не только подтверждают существование PSNO в клетках, но и указывают на их относительную стабильность, достаточную для запуска выработки антител и других процессов иммунной системы.

В работе [Liu et al., 2016] были исследованы периоды полураспада низкомолекулярных и связанных с белками нитрозотиолов в физиологических условиях. Изучались две наиболее широко изученные молекулы нитрозоцистеин (CysNO) и нитрозоглутатион (GSNO), которые к тому же являются донорами NO в системах *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что период полураспада CysNO в плазме составляет  $52 \pm 11$  минут, а GSNO –  $77 \pm 16$  минут. Однако в цельной крови период полураспада CysNO составляет  $14 \pm 5$  минут, что намного меньше периода полураспада GSNO ( $45 \pm 5$  минут). Это означает, что общая стабильность RSNO в плазме выше, чем в цельной крови. В митохондриях эндотелиальных клеток обнаружено присутствие *S*-нитрозилированных белков. Причем количество *S*-нитрозотиолов напрямую коррелирует с активностью эндогенных NOS.



**Рисунок 1.2.2. Пути образования и превращения низкомолекулярных (RSNO) и белковых (PSNO) нитрозотиолов внутри клетки.** 1 – ковалентное присоединение NO к сульфгидрильной группе белка, индуцированное АФА; 2 – превращение PSNO в дисульфид с высвобождением нитроксила; 3 – гомолитическое расщепление PSNO с образованием радикалов; 4 – денитрозилирование RSNO/PSNO глутатионом или денитрозилазами (тиоредоксины/глутаредоксины); 5 – транс-*S*-нитрозилирование PSNO другими тиолсодержащими белками. АФА – активные формы азота, GSH – восстановленный глутатион, PSNO – *S*-нитрозилированный белок, RSNO – *S*-нитрозотиол. Модифицировано по [Chatterji et al., 2021].

Были определены ключевые белки-мишени *S*-нитрозилирования: белки цитоскелета – виментин,  $\beta$ -актин; фермент гликолиза – глицеральдегид-фосфатдегидрогеназа; антиоксидантный фермент – пероксиредоксин-1. Кроме того, на сегодняшний день идентифицировано около тысячи белков

регуляторов транскрипции, подвергающихся *S*-нитрозилированию, включая Araf-1, HIF-1 $\alpha$ , каспазу-3, катепсин В, аннексин-1 и др. [Stomberski et al., 2019]. В работе [Mnatsakanyan et al., 2019] при исследовании 3,5 тысяч белков было выявлено около 8 тысяч сайтов *S*-нитрозилирования. Это указывает на то, что PSNO/RSNO стабильны в клетках в течение значительного периода времени, достаточного для протекания реакций транснаитрозилирования/*S*-нитрозилирования белков.

Гемоглобин является одним из хорошо изученных белков, SH-группы которого взаимодействует с NO, особенно в оксигенированной форме (оxуHb). Эта реакция способствует транспорту NO к гипоксическим тканям [Космачевская 2019]. *S*-нитрозилирование Hb было зарегистрировано как *in vitro*, так и *in vivo*, причем в последнем случае оно, предположительно, происходит посредством нитрозилирования с помощью GSNO [Chan et al., 1998; Космачевская 2019]. В легких, парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ) довольно высокое, что способствует образованию оxуHb и присоединению NO с образованием оxуHb-SNO. Покинув легкие, оxуHb-SNO поступает в ткани с более низким  $pO_2$ , в которых Hb, отдавая кислород, переходит в дезоксиформу, которая имеет более низкое сродство к NO и высвобождает либо свободный NO, либо NO, связанный с тиолами (RSNO). В результате этого процесса NO поступает в гипоксические ткани, вызывая расширение сосудов и улучшение кровотока. Напротив, в тканях с более высоким  $pO_2$ , оxуHb остается связанным с NO, что свидетельствует о существовании *S*-нитрозилированного Hb в покоящихся тканях. Исследования также подтвердили, что воздействие NO на Hb приводит к полному *S*-нитрозилированию двух реакционноспособных остатков цистеина  $\beta 1Cys93$  и  $\beta 2Cys93$  и образованию стабильного оxуHb-SNO. Однако остальные четыре цистеиновых остатка Hb ( $\alpha 1Cys104$ ,  $\alpha 2Cys104$ ,  $\beta 1Cys112$  и  $\beta 2Cys112$ ) не участвуют в *S*-нитрозилировании даже при более высоких концентрациях NO, что согласуется с данными об их удаленном расположении от внешней поверхности белка [Zhang et al., 2015]. Цикл *S*-нитрозилирования и



высвобождения NO, осуществляемый Hb, имеет большое значение для регуляции кровотока [Doulias et al., 2010]. Так, у мутантных мышей с нарушенной функцией высвобождения NO эритроцитами наблюдалась ишемия миокарда, снижение периферического кровотока и оксигенации тканей.

### 1.2.2. Динитрозильные комплексы железа

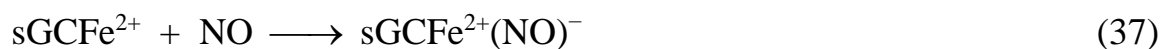
#### *Реакционная способность и динамика ДНКЖ*

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиоловыми лигандами были обнаружены еще в 60-х годах XX века тремя независимо работающими группами исследователей в СССР, США и Великобритании [Ванин, 2015]. Обнаружены эти комплексы с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) по характерному анизотропному сигналу ЭПР с  $g = 2,03$ .

ДНКЖ являются физиологической формой депонирования и транспорта NO в живых организмах [Tsai et al., 2015; Vanin, 2019]. Образование этих комплексов было зарегистрировано в организме человека, животных, растений и бактерий [Ванин, 2015]. Несмотря на четыре десятилетия активных исследований, ДНКЖ до сих пор являются наименее изученными метаболитами NO. До конца не разрешены такие вопросы как их образование, реакционная способность, а также роль в физиологических и патологических процессах.

Взаимодействие NO с металлами происходит в основном в виде реакций с гемовыми и негемовыми центрами железа [Toledo, Augusto, 2012; Wink, Mitchell, 1998]. Реакции с железом гема могут быть обратимыми и необратимыми. Например, NO необратимо реагирует с  $\text{oxyHb}$  ( $k = 3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (реакция 36). Эта реакция имеет значение для контроля уровней NO в кровотоке [Doyle, Hoeskstra, 1981]. Обратимые реакции NO с гемовыми центрами ответственны за биорегуляторные процессы. В качестве примера

можно привести активацию растворимой гуанилатциклазы (sGC) (реакция 37) – ключевой этап в контроле релаксации сосудов и артериального давления.

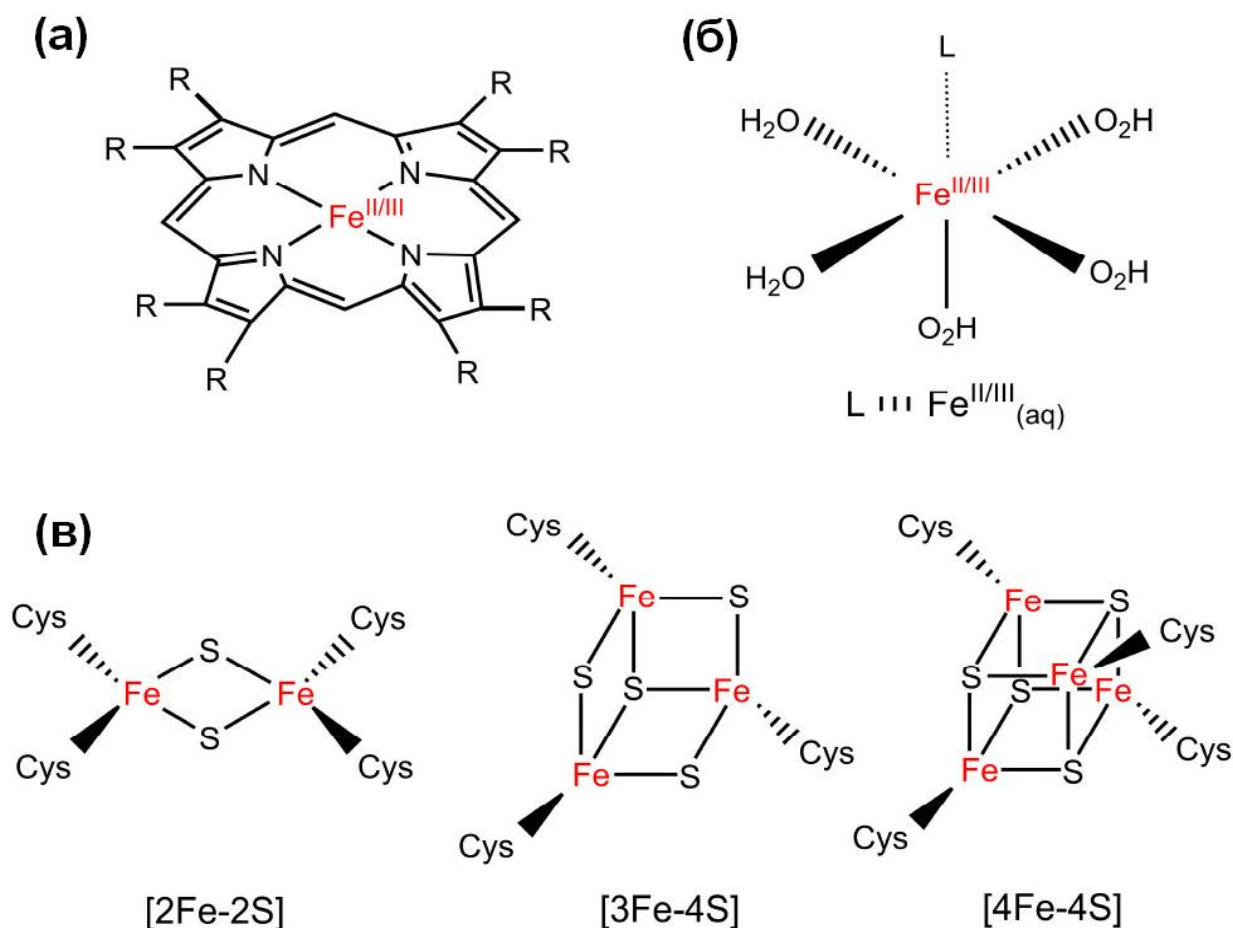


В отличие от вышеприведенных реакций, механизмы взаимодействия NO с негемовым железом изучены гораздо хуже. В живых организмах центры негемового железа представлены в основном пулом лабильного железа (Labile Iron Pool – LIP) и железо-серными (Fe-S) кластерами. В реакциях этих железосодержащих центров с NO образуются ДНКЖ.

### *Пул лабильного железа*

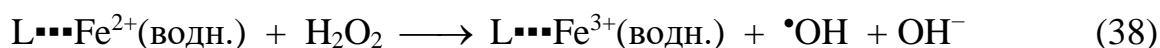
Внутриклеточное железо, как правило, включено в состав гемовых центров или Fe-S кластеров (рисунок 1.2.3. а и б), которые являются простетическими группами белков. Только небольшая фракция двухвалентного железа, слабо связанная с белками и низкомолекулярными веществами, составляет пул лабильного железа [Lv et al., 2018] (рисунок 1.2.3. в). Железо, поступившее в клетку, сначала включается в LIP, который направляется в митохондрии для последующего встраивания в гемовые и Fe-S кластерные белки или в ферритин [Katsarou et al., 2020; Breuer et al., 2008].

Химическую природу LIP сложно определить, поскольку в клетке происходит постоянный обмен лигандами [Breuer et al., 2008]. Считается, что основным лигандом является глутатион, поскольку в клетке он присутствует в высокой концентрации (2–10 мМ) и имеет высокое сродство к  $\text{Fe}^{2+}$  ( $k = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Hider et al., 2011]. Кроме того, недавние исследования показали, что GS- $\text{Fe}^{2+}$  может связываться с представителями семейства поли-S-связывающих белков и затем участвовать в распределении железа для депонирования, транспорта или использования в качестве кофактора [Philpott et al., 2022].



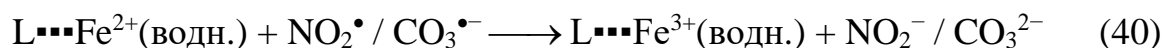
**Рисунок 1.2.3. Биологические железосодержащие центры.** (а) железо, координированное порфирином (гемовая группа); (б) LIP, где L – цитозольная молекула, например, GSH; (в) – Fe-S кластеры. Модифицировано по [Truzzi et al., 2021].

К настоящему времени накопилось достаточное количество данных, свидетельствующих о том, что LIP может выступать в роли прооксиданта, поскольку он способен реагировать с перекисью водорода (реакция Фентона) с образованием гидроксильных радикалов (реакция 38).

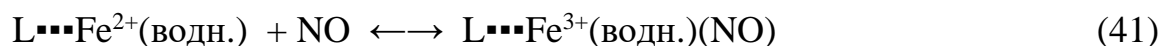


Недавние исследования показали, что LIP также может быть и антиоксидантом [Damasceno et al., 2018; Camiolo et al., 2020]. Антиоксидантное действие возможно связано со способностью восстанавливать пероксинитрит (реакция 39) и производные от него радикалы (реакция 40) [Damasceno et al., 2018]. Конечные продукты реакции 40 не являются окислителями, в то время как оксоферрильный продукт ( $L\cdots Fe^{4+}=O$ )

реакции 39, предположительно, менее реакционноспособен, чем пероксинитрит, и может быть восстановлен глутатионом и аскорбатом. С другой стороны, оксоферрильные комплексы могут восстанавливаться и оксидом азота [Herold et al., 2003; Шумаев с соавт., 2004].



В нескольких исследованиях было показано, что LIP также является основной мишенью для NO [Toledo et al., 2008; Bosworth et al., 2009; Nickok et al., 2011]. Действительно, в растворе  $Fe^{2+}$  и NO быстро устанавливается равновесие ( $k_{on} = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{off} = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) с мононитрозильным комплексом железа [ $Fe^{2+}(\text{водн.})(NO)$ ]. LIP реагирует с NO быстрее (реакция 41), чем растворенное в воде  $Fe^{2+}$  [Schneppensieper et al., 2002]. Однако в биологических системах этот мононитрозильный комплекс железа недолговечен из-за последующих реакций с тиолами, которые приводят к формированию ДНКЖ.



По данным количественных исследований ДНКЖ являются одними из наиболее распространенных метаболитов NO в клетках [Li et al., 2014; Nickok et al., 2011], что указывает на то, что скорость их образования превосходит скорости других реакций NO внутри клетки. Следовательно, сборка ДНКЖ снижает доступность редокс-активного железа (LIP) и NO, тем самым подавляя как реакцию Фентона, так и образование пероксинитрита. Поэтому не удивительно, что образование этих комплексов снижает окислительный стресс внутри клетки [Sergent et al., 1997; Dungal et al., 2015; Shumaev et al., 2008, 2019; Kosmachevskaya et al., 2021; Шумаев с соавт., 2021].

Показано, что в макрофагах LIP превращаются в ДНКЖ при взаимодействии с NO [Toledo et al., 2008]. Вероятно, что и в эритроцитах ДНКЖ образуются с участием LIP. Источником NO для формирования этих комплексов может быть NO-синтаза эритроцитов (eNOS) [Cortese-Krott, Kelm,

2014] и нитритредуктазные реакции, в том числе с участием гемоглобина [Huang et al., 2005; Patel et al., 2011].

### ***ДНКЖ: структура и обнаружение***

ДНКЖ характеризуются фрагментом  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$  [Lu et al., 2018; Hsieh et al., 2013]. Форма и ширина сигналов ЭПР белковых ДНКЖ определяются анизотропией g-фактора ( $g_{\perp} = 2,04$ ;  $g_{\parallel} = 2,014$ ) и сверхтонкой структурой (СТС), которая не меняется при возрастании температуры от 77 К до температуры окружающей среды [Ванин, 2015; Vanin, 2016, 2019]. При таких условиях подвижность белка слишком мала, чтобы получить усреднение анизотропии g-фактора и СТС; такие различия более характерны для низкомолекулярных цистеиновых и глутатионовых ДНКЖ. При комнатной температуре тиоловые ДНКЖ дают синглетный сигнал с полушириной 0,7 мТл при  $g_{\text{iso}} = 2,03$  и разрешённой СТС с 13 компонентами. Этот сигнал является результатом сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с ядрами азота двух лигандов  $\text{NO}^+$  и протонами четырех метиленовых групп, находящихся вблизи от атома серы двух цистеиновых или глутатионовых лигандов.

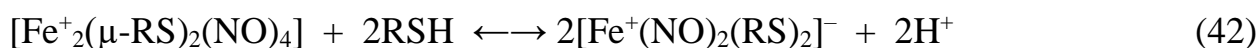
Лиганды эндогенных ДНКЖ в основном представлены низко- или высокомолекулярными тиолами и характеризуются формулой  $\{(\text{RS}^-)_2\text{-Fe}^+(\text{NO}^+)_2\}$  [Bosworth et al., 2009; Vanin, 2016, 2019]. В качестве лигандов этих комплексов чаще всего выступают такие тиолсодержащие соединения как глутатион и цистеин [Lewandowska et al., 2010; Vanin, 2016; Vanin, 2019].

До сих пор существуют споры относительно электронной структуры ядра  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$  в ДНКЖ. Электронная конфигурация NO (неспаренный электрон на  $\pi^*$ -орбитали), энергия и симметрия d-орбиталей атома Fe способствуют делокализации связи металл-NO. Поэтому  $\text{Fe}^+(\text{NO})_2$  и  $\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$  или  $\text{Fe}^+(\text{NO})_2$  и  $\text{Fe}^{3+}(\text{NO}^-)_2$  являются одними из возможных резонансных гибридов. Природа лигандов определяет вклад каждого гибрида. Например, ДНКЖ, содержащие лиганды с O-связью, как правило, имеют более характерные черты  $\text{Fe}^{3+}(\text{NO}^-)_2$ , по сравнению с ДНКЖ, содержащими лиганды с S-связью [Lu et al., 2018]. Преобладающие степени окисления железа и NO

водорастворимых ДНКЖ, содержащих физиологические лиганды, до сих пор плохо изучены.

Хотя низкомолекулярные ДНКЖ и ДНКЖ, связанные с белком, дают анизотропные сигналы ЭПР в замороженном растворе (77 К), они имеют отчетливые сигналы при комнатной температуре (рисунок 1.2.4., вставка). Спектр ЭПР низкомолекулярных ДНКЖ характеризуется одной симметричной линией (изотропные спектры) при  $g = 2,03$ , в то время как координация высокомолекулярного лиганда к ДНКЖ замедляет скорость ее вращения и увеличивает анизотропию, что дает сигналы аксиальной или ромбической симметрии (рисунок 1.2.4., вставка). Благодаря этому свойству было показано, что внутриклеточные ДНКЖ в основном представлены высокомолекулярными формами [Toledo et al., 2008].

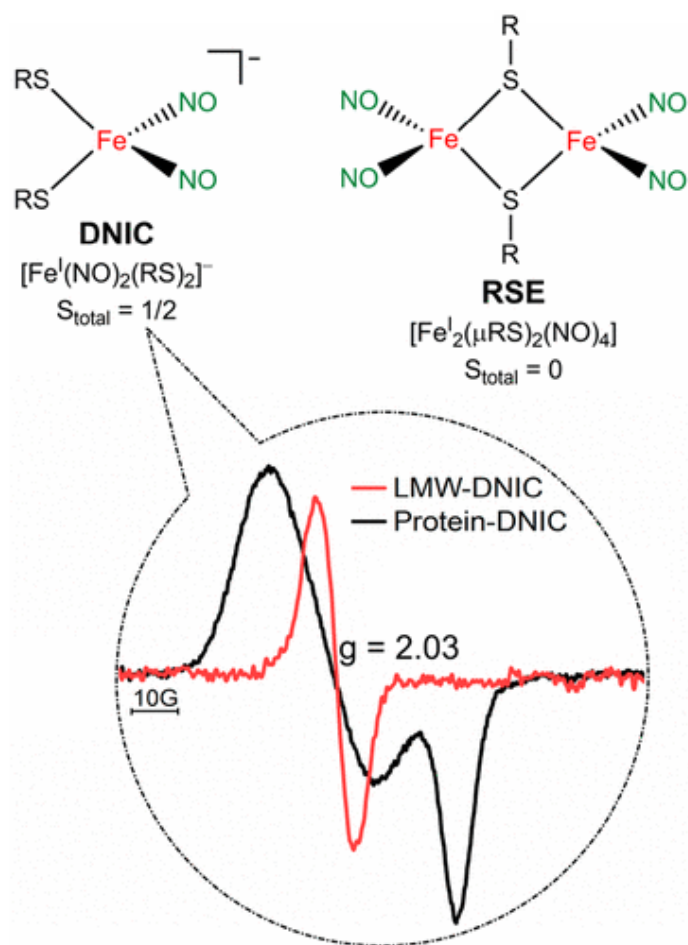
Низкомолекулярные тиоловые ДНКЖ в водной среде существуют в виде двух форм моноядерной (М-ДНКЖ) и биядерной (Б-ДНКЖ), равновесие между которыми зависит от pH и концентрации тиола (RSH) (реакция 42):



При более высоких значениях pH преобладают М-ДНКЖ, поскольку в этих условиях увеличивается концентрация тиолат-аниона [Vanin et al., 2010; Pereira et al., 2015]. Низкие значения pH благоприятствуют образованию Б-ДНКЖ. Для  $\text{RSH} = \text{GSH}$  константа равновесия ( $K = [\text{ДНКЖ}]_2 / [\text{RSE}][\text{GSH}]_2$ ) при pH 7,4 и 3,6 mM GSH была определена как  $0,2 \text{ M}^{-1}$  [Truzzi et al., 2019]. Это означает, что в физиологических условиях на каждую молекулу моноядерного GS-ДНКЖ приходится около четырех биядерных комплексов. Динитрозильные комплексы железа, содержащие высокомолекулярные тиолы, менее динамичны и обычно присутствуют в растворе преимущественно в одной форме.

Одно из принципиальных отличий между структурами М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ заключается в том, что моноядерная форма является парамагнитной ( $S_{\text{total}} = 1/2$ ), и поэтому легко детектируется с помощью ЭПР по характерному сигналу с  $g \sim 2,03$ , тогда как биядерная форма ЭПР недетектируемая ( $S_{\text{total}} = 0$ )

[Truzzi et al., 2019; Ford et al., 2013; Vanin, 2009] (рисунок 1.2.4.). Строение биядерных комплексов до сих пор обсуждается. Некоторые исследователи полагают, что в биядерных комплексах атомы серы связывают атомы железа также как в эфирах красной соли Руссена. Согласно другому мнению биядерные комплексы представляют собой димерные ассоциаты моноядерных нитрозильных комплексов.



**Рисунок 1.2.4. Общая структура моноядерных и биядерных (RSE – сложный эфир красной соли Руссена) ДНКЖ. Вставка: спектры ЭПР, полученные при pH 7,4 и комнатной температуре, низкомолекулярных ДНКЖ, где RS – глутатионат (красная линия), и связанные с белком ДНКЖ, в которых RS представляет собой остатки цистеина пероксиредоксина 1 (черная линия). Модифицировано по [Truzzi et al., 2021].**

Интересно, что в тканях животных преобладают Б-ДНКЖ, а М-ДНКЖ составляют лишь небольшую долю [Crack et al., 2014, 2019; Ekanger et al., 2018], в то время как в культуре клеток животных образуются преимущественно М-ДНКЖ [Ванин, 2015]. Причины этого до сих пор не известны. Можно лишь предположить, что активно пролиферирующие клетки в культуре имеют более высокий уровень GSH и более высокий pH [Flinck et al., 2018], что и способствует смещению равновесия в сторону моноядерной формы.

Транскрипционные факторы, относящиеся к семейству WhiB-подобных белков, актиномицетов и микобактерий содержат [4Fe-4S] кластер, который быстро реагирует с NO, образуя Б-ДНКЖ (реакция 43):



Поскольку концентрацию Б-ДНКЖ сложно определить, то вполне вероятно, что содержание ДНКЖ в клетках значительно выше, чем их оценивают (0,5-0,9 нмоль/мг белка) [Nickok et al., 2011; Li et al., 2014]. К тому же широко используемые колориметрические и хемилюминесцентные методы количественного определения *S*-нитрозотиолов, основанные на методе Сэвилла [Saville, 1958], не учитывают влияние HgCl<sub>2</sub> на стабильность ДНКЖ. Кезлер с соавторами [Keszler et al., 2017] показали, что HgCl<sub>2</sub> ускоряет распад ДНКЖ, что приводит к ошибочному определению концентрации *S*-нитрозотиолов. Поэтому необходимо разработать простые и чувствительные аналитические методы обнаружения и количественного определения ДНКЖ в биологических системах, содержащих другие метаболиты NO.

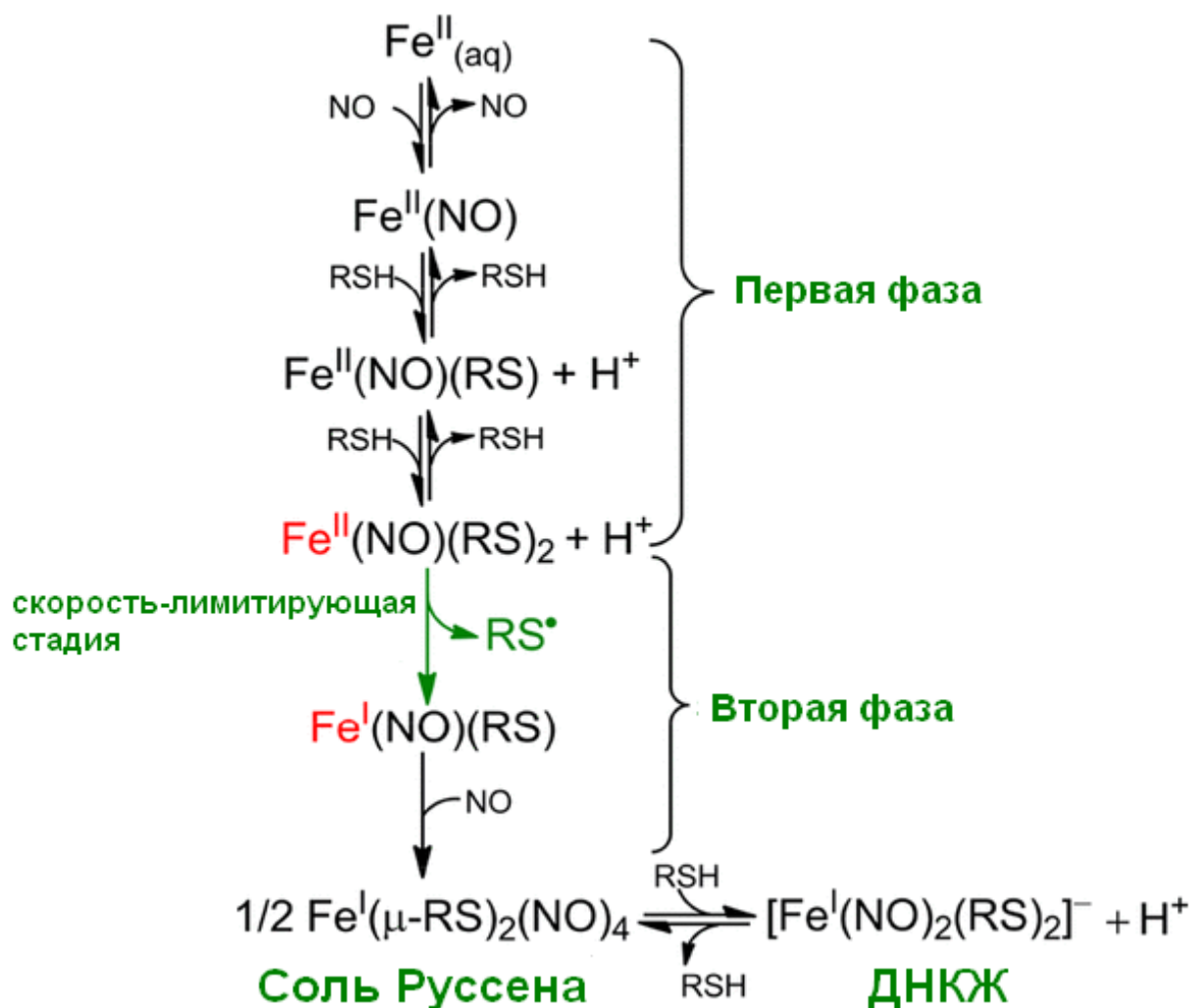
Связанные с белками ДНКЖ также могут образовываться путем обмена лигандами в реакциях между низкомолекулярными ДНКЖ и белками. Было показано, что сывороточный альбумин, метгемоглобин [Shumaev et al., 2008], глутатион-*S*-трансфераза [Maria et al., 2003; Vocedi et al., 2013] и пероксиредоксин [Truzzi et al., 2020] реагируют с GS-ДНКЖ с образованием белок-связанных ДНКЖ. Скорости, с которыми эти белки формируют ДНКЖ, значительно различаются. Например, пероксиредоксин I реагирует с GS-ДНКЖ с  $k_{\text{on}} = 7,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH 7,4 и 25°C) [Truzzi et al., 2020], в то время как глутатион-*S*-трансфераза реагирует намного быстрее с  $k_{\text{on}} = 10^5\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH 7,4 и 25°C) [Maria et al., 2003]. Вполне вероятно, что многие белковые ДНКЖ образуются в реакциях обмена лигандами. Однако биологическая значимость этих реакций не вполне ясна и требует дальнейшего изучения.



### *Механизмы образования ДНКЖ*

Эксперименты на клетках, подвергшихся воздействию NO или продуцирующих его, показали, что LIP является основным, а также исходным источником железа для сборки ДНКЖ. [Toledo et al., 2008; Nickok et al., 2011]. Было показано, что сборка ДНКЖ происходит достаточно быстро и зависит от концентрации LIP и NO. Кроме этого, формирование ДНКЖ происходит в клетках в условиях аноксии, что свидетельствует о том, что синтез ДНКЖ является O<sub>2</sub>-независимым процессом.

Формирование тиоловых ДНКЖ довольно сложный процесс. В работе [Truzzi et al., 2021] описан механизм образования ДНКЖ в реакционной системе, содержащей NO, Fe<sup>2+</sup>(водн.) и цистеин или цистеинсодержащие пептиды в водной среде при pH 7,4 в отсутствие кислорода. Процесс сборки ДНКЖ включает две фазы. Первая фаза протекает быстро в течение десятков миллисекунд и состоит из серии обратимых реакций замещения водного Fe<sup>2+</sup> с образованием мононитрозильного интермедиата Fe<sup>2+</sup>(NO)(RS)<sub>2</sub> (рисунок 1.2.5.). Вторая фаза длится несколько секунд и завершается появлением соли Руссена и ДНКЖ. Анализ кинетических данных второй фазы в различных экспериментальных условиях показал, что ее скорость в основном зависит от концентрации Fe<sup>2+</sup>(NO)(RS)<sub>2</sub>. Предполагается, что вторая фаза представляет собой спонтанное мономолекулярное самовосстановление частиц Fe<sup>2+</sup>(NO)(RS)<sub>2</sub> с образованием новых мононитрозильных комплексов Fe<sup>+</sup>(NO)(RS) и тиольного радикала (RS<sup>•</sup>) в качестве побочного продукта образования ДНКЖ. Fe<sup>+</sup>(NO)(RS) быстро реагирует с другой молекулой NO (рисунок 1.2.5.).

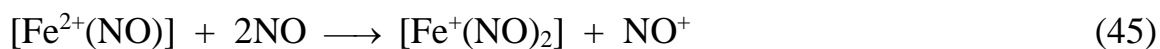
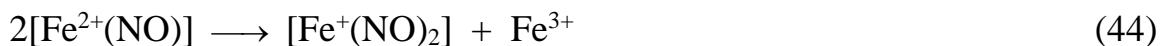


**Рисунок 1.2.5.** Предполагаемый общий механизм образования низкомолекулярных ДНКЖ в водной среде. Модифицировано по [Truzzi et al., 2021].

Несмотря на то, что тиолы являются основными эндогенными лигандами ДНКЖ, нетиоловые лиганды, такие как фосфат, арсенат и бензоат, также могут реагировать с  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{NO}$ , давая сигнал ЭПР с  $g = 2,03$  [McDonald et al., 1965; Vanin, 2020]. В этих случаях механизмы образования ядра  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$  ДНКЖ могут включать диспропорционирование  $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})]$  (реакция 44) или реакцию с  $\text{NO}$  (реакция 45) [Speelman et al., 2016; In-Iam et al., 2018].

Ванин А.Ф. в своих работах придерживается другой точки зрения, согласно которой ДНКЖ содержат  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^7$ , а образование ДНКЖ с

тиоловыми и нетиоловыми лигандами включает стадию диспропорционирования NO (реакция 46) [Vanin, 2020].



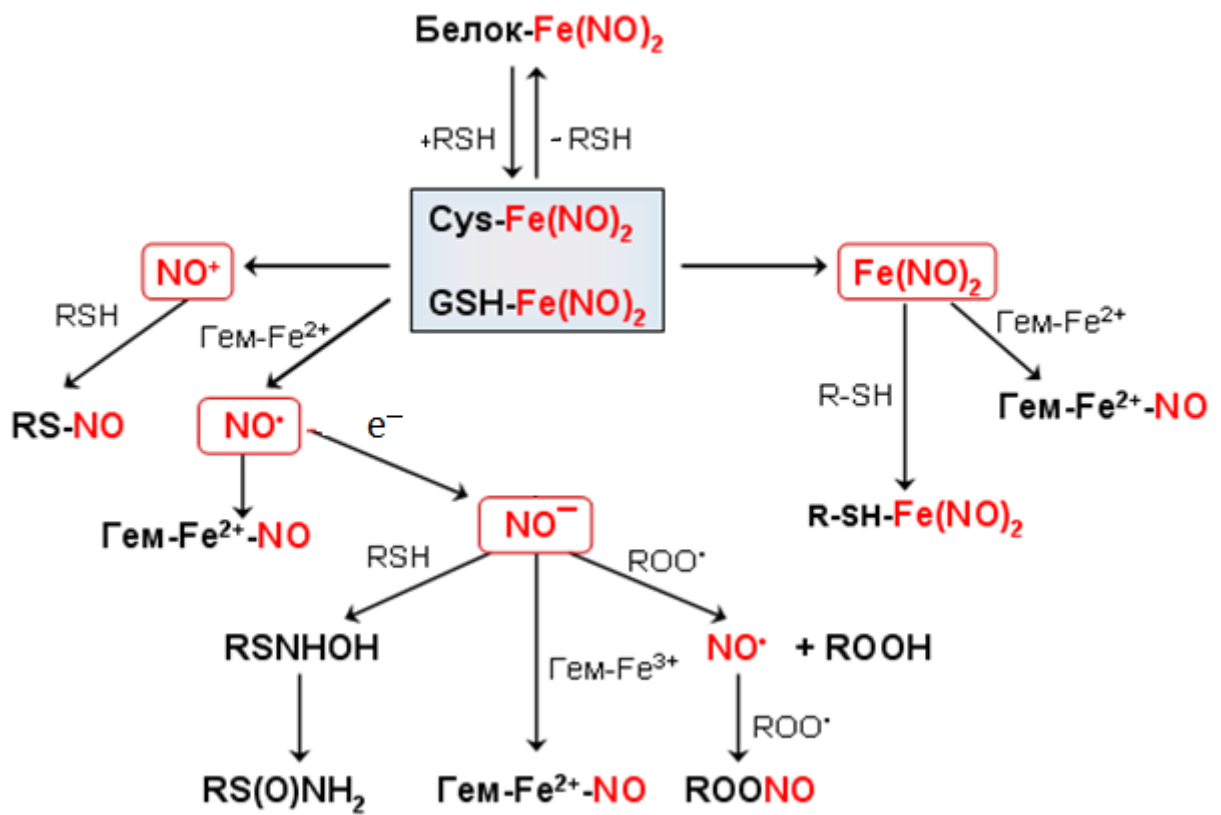
В экспериментальных системах, моделирующих воспалительные и невоспалительные состояния, была оценена скорость образования ДНКЖ. При невоспалительных состояниях 94% всего продуцируемого NO включалось в ДНКЖ. В условиях воспаления скорость образования ДНКЖ значительно увеличивалась и  $\text{Fe}^{2+}$  (водн.) полностью превращался в комплексы в течение 8 секунд. Согласно этим данным, ДНКЖ представляют собой наиболее распространенный аддукт NO в клетках, продуцирующих NO [Nickok et al., 2011].

### ***Биологические роли эндогенных ДНКЖ***

В живых системах RS-ДНКЖ представляют собой «рабочую» форму эндогенного оксида азота. Они оказывают на биологические системы разнообразное действие. Это мощное вазодилататорное и гипотензивное действие [Vanin et al., 2007; Chazov et al., 2012], протекторное действие на миокард при экспериментальном инфаркте миокарда [Kapelko et al., 2017], повышение эластичности эритроцитов [Shamova et al., 2011], ускорение заживления кожных ран [Igrunkova et al., 2023], пенис-эректильное действие [Andreyev-Andriyevsky et al., 2011], протекторное действие при геморрагическом шоке [Remizova et al., 2011]. Все это многообразие положительных эффектов позволяет рассматривать RS-ДНКЖ как основу для создания медицинских препаратов с широкой терапевтической активностью. Уже разработан и прошел клинические испытания гипотензивный препарат «Оксаком», основой которого является биядерный ДНКЖ с глутатионом [Chazov et al., 2012; Родненков с соавт., 2016].

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена способностью комплексов выступать в биосистемах в качестве доноров NO и

$\text{NO}^+$ , которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов [Ванин с соавт., 2022; Васильева с соавт., 2023]. Включение этих малых сигнальных молекул в ДНКЖ обеспечивает их стабилизацию и транспорт внутри и вне клеток и тканей без самопроизвольного высвобождения. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать  $\text{NO}$  и  $\text{NO}^+$  на гем- и тиолсодержащие белки, тем самым влияя на метаболизм. Данные процессы в общем виде проиллюстрированы на рисунке 1.2.6.



**Рисунок 1.2.6.** Динитрозильные комплексы железа — доноры  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$  и  $\text{Fe}(\text{NO})_2$ .

RS-ДНКЖ также обеспечивают образование *S*-нитрозотиолов. Если в среде много  $\text{NO}$ , то тиольные радикалы, возникающие в ходе сборки ДНКЖ (рисунок 1.2.5.), будут реагировать с  $\text{NO}$  со скоростью, ограниченной диффузией, ( $k = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , если  $\text{RS}^• = \text{GS}^•$ ) с образованием  $\text{RSNO}$  [Madej et al., 2008]. Эта реакция обеспечивает один из путей образования *S*-

нитрозотиолов. Другой путь связан с переносом нитрозильных ( $\text{NO}^+$ ) групп на тиолы при распаде ДНКЖ. Оба механизма позволяют быстро и специфично образовать *RSNO in vivo* и могут играть роль в процессах передачи сигналов  $\text{NO}$ . Например, в макрофагах, активированных липополисахаридами, образование *RSNO* происходит параллельно с образованием ДНКЖ, причем концентрация комплексов в 4-10 раз превышает концентрацию нитрозотиолов [Keszler et al., 2017].

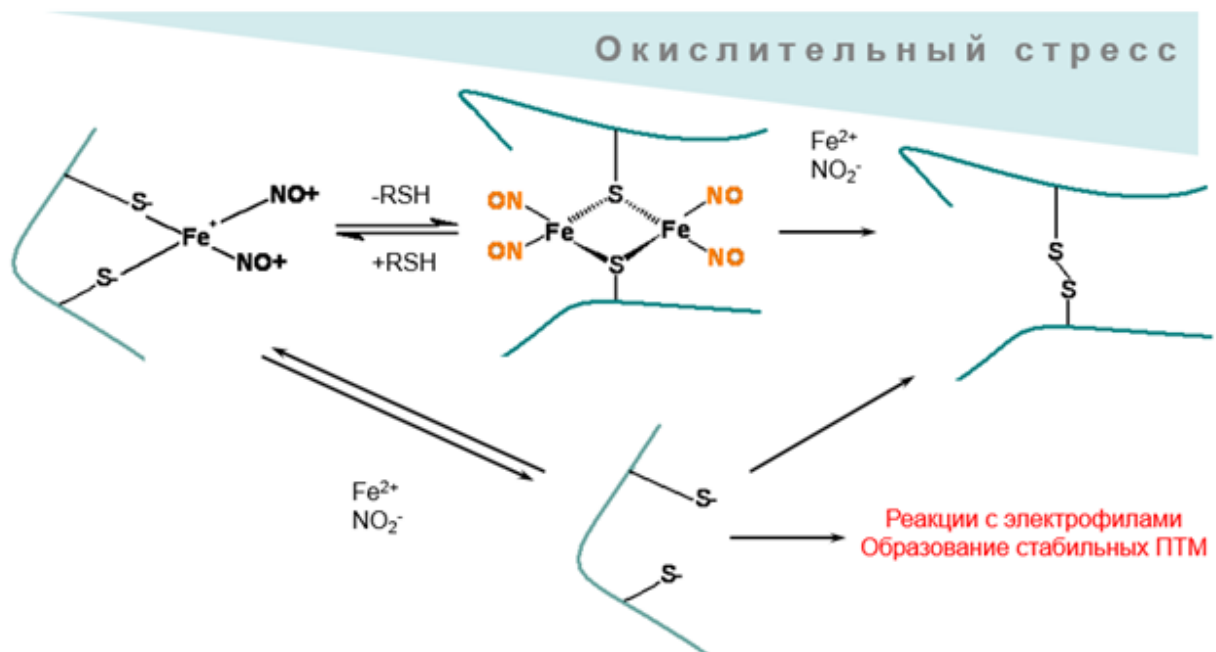
Имеющиеся данные свидетельствуют, что прямое *S*-нитрозилирование динитрозильными комплексами железа маловероятно [Truzzi et al., 2021]. Однако окружение остатков цистеина отрицательно или положительно заряженными аминокислотами в пределах 6 Å, может обеспечить условия для *S*-нитрозилирования с помощью комплексов.

*S*-нитрозилирование остатков цистеина белков и ферментов является важным медиатором биологического действия эндогенного  $\text{NO}$  [Bosworth et al., 2009; Stomberski et al., 2019]. Кроме этого, *S*-нитрозотиолы проявляют большую устойчивость к действию  $\text{O}_2^{\bullet-}$  по сравнению с ДНКЖ, поэтому реакции низкомолекулярных ДНКЖ с тиолами ведут к быстрому накоплению *S*-нитрозотиолов в клетках и тканях. Не исключено, что это действие ДНКЖ является его главной физиологической ролью в живых системах.

### ***Роль ДНКЖ в настройке реакционной способности SH-групп белков***

Низкомолекулярные *RS*-ДНКЖ в организме всегда существуют в равновесии с белковыми ДНКЖ [Vanin, 2016, 2019]. Равновесие это определяется редокс условиями, а именно состоянием системы глутатиона. Уменьшение пула *GSH* сдвигает равновесие в сторону более стабильных ДНКЖ, связанных с белками. Редокс-условия также влияют и на равновесие между *M*-ДНКЖ и *B*-ДНКЖ (рисунок 1.2.7.). По мере окисления *SH*-групп *M*-ДНКЖ постепенно димеризуются с образованием *B*-ДНКЖ, которые более устойчивы к окислению [Vanin, 2016, 2019]. В присутствии высокой концентрации тиолов *B*-ДНКЖ снова переходят в моноядерную форму.

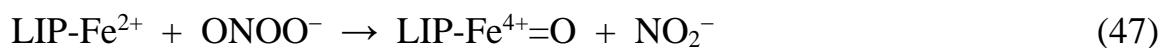
Благодаря такой редокс-зависимой динамики ДНКЖ могут оказывать модулирующее влияние на белки [Boese et al., 1997; Lewandowska et al., 2010; Космачевская с соавт., 2020]. Например, ДНКЖ могут выступать в роли регуляторов реакционной способности белковых тиолов [Космачевская с соавт., 2020]. Включение белковых тиолов в состав ДНКЖ, с одной стороны, защищает их от окисления гидропероксидами, а, с другой стороны, в случае распада комплексов при высоких концентрациях окислителя тиол может высвободиться в виде тиолат-аниона ( $R-S^-$ ), реакционная активность которого значительно выше, чем у протонированной формы тиола (Cys-SH). Тиолат-анион проявляет повышенную реакционную способность по отношению к электрофильным соединениям, что приводит к формированию стабильной модификации белкового тиола. Таким образом, включение SH-групп в ДНКЖ позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов в условиях незначительного окислительного стресса и, наоборот, ускорить их при высоком уровне стресса (рисунок 1.2.7.).



**Рисунок 1.2.7. Формирование динитрозильных комплексов железа как способ настройки реакционной способности белковых SH-групп.**

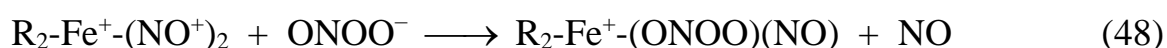
### *ДНКЖ – перехватчики пероксинитрита*

В работе [Damasceno et al., 2019] было высказано предположение, что LIP перехватывает  $\text{ONOO}^-$  и свободные радикалы, являющиеся его производными, в том числе  $\cdot\text{NO}_2$  и  $\cdot\text{CO}_3$ . Антиоксидантное действие двухвалентного железа по отношению к пероксинитриту объясняется способностью восстанавливать его до нитрита по двухэлектронному механизму со скоростью, характеризующейся константой, на два порядка превышающей константу скорости реакции  $\text{ONOO}^-$  с  $\text{CO}_2$  [Damasceno et al., 2018]. Считается, что в этой реакции LIP превращается в оксоферрильный интермедиат [Damasceno et al., 2018]:

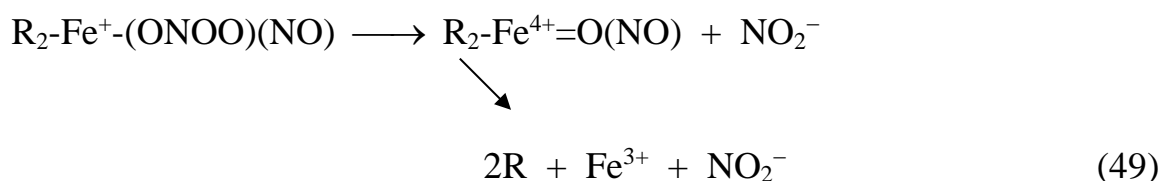


Оксоферрильный интермедиат менее реакционноспособен, чем пероксинитрит, и может быть восстановлен глутатионом и аскорбатом. С другой стороны, оксоферрильные комплексы могут восстанавливаться и оксидом азота [Шумаев с соавт., 2004].

Можно предложить механизм взаимодействия ДНКЖ с пероксинитритом, основанный на антиоксидантных свойствах LIP и NO. На первом этапе образуется комплекс, содержащий связанный пероксинитрит:



Этот комплекс превращается в оксоферрильный интермедиат, который далее восстанавливается NO с образованием нитрита:



В свою очередь, ионы трехвалентного железа способствуют гомолитическому расщеплению пероксинитрита и усилению реакций окисления и нитрования [Radi, 2013; Bartesaghi, Radi, 2018].

Антиоксидантное действие ДНКЖ по отношению к белкам может быть связано с переносом электронов между железом и NO внутри комплекса

$[\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$  с появлением ионов нитроксила ( $\text{NO}^-$ ) и нитрозония ( $\text{NO}^+$ ), реакционная способность которых выше, чем у нейтральной молекулы  $\text{NO}$  [Beckman, Koppenol, 1996; Tsai et al., 2015; Bartesaghi, Radi, 2018]. В частности, ион нитрозония в составе ДНКЖ реагирует с тиоловыми группами с образованием *S*-нитрозотиолов [Vanin, 2019]. Посредством этих взаимодействий ДНКЖ могут участвовать в редокс-сигнализации, обеспечивающей защиту от окислительного стресса.

Антиоксидантные свойства ДНКЖ на первый взгляд кажутся парадоксальными, поскольку комплексы редокс-активных металлов, как уже отмечалось, стимулируют окислительную модификацию белков. В нашей лаборатории проводятся исследования анти/прооксидантных свойств ДНКЖ с различными лигандами. Показано, что эти комплексы оказывают антиоксидантное действие на белковые системы в условиях окислительного стресса [Shumaev et al., 2008; Космачевская с соавт., 2021; Kosmachevskaya et al., 2021; Шумаев с соавт., 2001, 2021]. Благодаря этому свойству они оказывают также и цитопротекторный эффект [Martusevich et al., 2014, 2018; Dungal et al., 2015; Kapelko et al., 2017; Shumaev et al., 2019; Akentieva et al., 2019]. В частности, глутатионовые ДНКЖ в микромолярных концентрациях эффективно ингибируют лизис эритроцитов, индуцированный  $\text{HOCl}$ , и удаляют алкоксильные ( $\text{RO}^\bullet$ ) и алкилпероксильные ( $\text{ROO}^\bullet$ ) радикалы, образующиеся в реакции  $\text{HOCl}$  с гидропероксидом *трет*-бутила [Shumaev et al., 2019]. Причем GS-ДНКЖ оказались более эффективными цитопротекторами и поглотителями органических свободных радикалов, чем восстановленный глутатион. В последнее время показано, что ДНКЖ с глутатионовыми и цистеиновыми лигандами обладают противовирусным действием, в том числе и по отношению к COVID-19 [Vanin et al., 2021].

Протекторное (регуляторное) действие ДНКЖ обусловлено нейтральными молекулами  $\text{NO}$ , а цитотоксическое – ионами нитрозония



(NO<sup>+</sup>), высвобождающихся из комплексов [Vasilieva et al., 2019; Vanin et al., 2021; Vanin, 2022; Васильева с соавт., 2023; Ванин с соавт., 2022].

Низкомолекулярные и связанные с белками ДНКЖ перехватывают супероксидный анион-радикал [Shumaev et al., 2008; Shumaev et al., 2018]. GS-ДНКЖ восстанавливают оксоферрильную форму миоглобина (Mb-Fe<sup>4+</sup>=O) до нетоксичной метформы [Шумаев с соавт., 2004], также ДНКЖ, связанные с гемоглобином, защищают входящие в их состав тиоловые группы от окисления [Shumaev et al., 2008]. В этих экспериментах в качестве инициаторов окисления использовали пероксид водорода и гидропероксид *трет*-бутила. ДНКЖ также эффективно ингибируют окисление β-каротина, вызванное пероксинитритом [Шумаев с соавт., 2001].

### ***ДНКЖ – посредники биологической активности нитритов***

В настоящее время общепризнано, что нитрит-ион является важной молекулой для хранения и доставки NO в разные ткани организма, в частности, в ткани сердца. Проведено много исследований по изучению защитной функции этого аниона в условиях ишемических повреждений различных органов [Реутов с соавт., 1998]. В условиях ишемии нитриты являются основным источником NO [Реутов с соавт., 1998; Dezfulian et al., 2007]. Нитриты восстанавливаются до NO, который защищает клетки и ткани от ишемического повреждения благодаря действию на различные сигнальные пути посредством активации растворимой гуанилатциклазы и/или цГМФ-независимого транснаитрозилирования. NO также взаимодействует с LIP, образуя ДНКЖ (рисунок 1.2.8). Таким образом, предотвращается участие ионов железа в процессах свободнорадикального окисления. Показано, что добавление нитрита в корм животных приводит к образованию ДНКЖ в тканях печени и почек [Thomas et al., 2018].

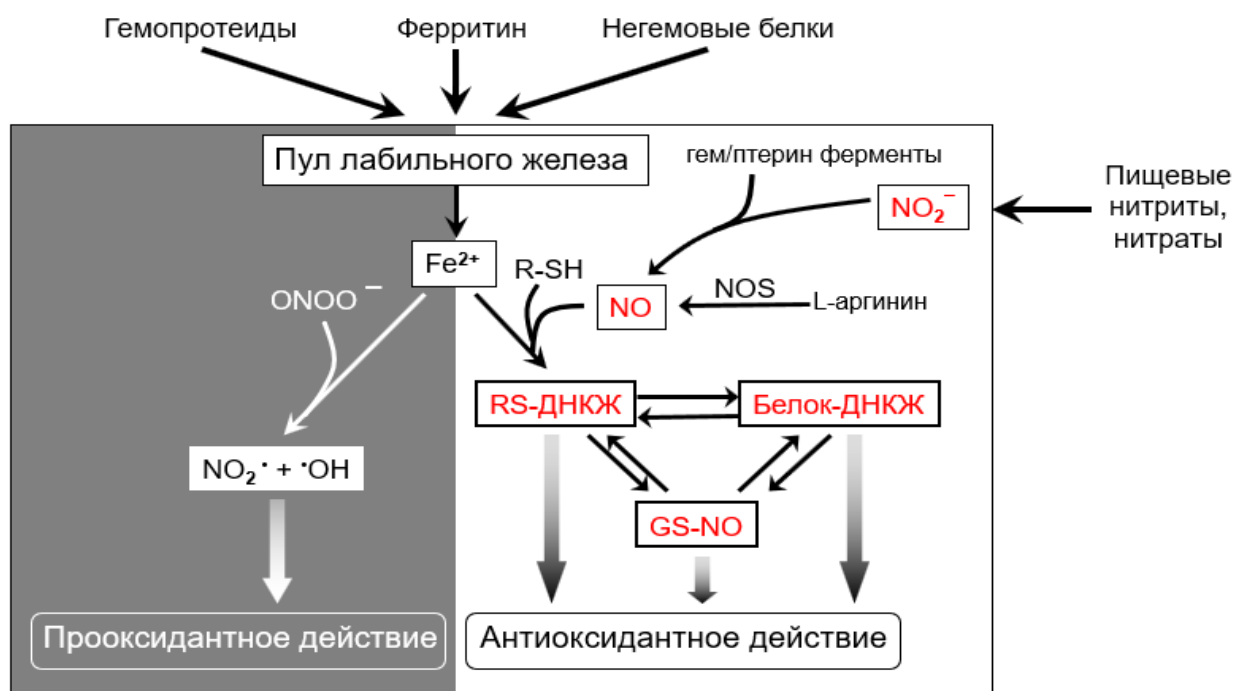
К настоящему времени накопилось немало работ, свидетельствующих, что нитрит ослабляет повреждение сердца, мозга, почек и печени, вызванное ишемией/реперфузией [Dezfulian et al., 2007; Kobayashi, Murata, 2018]. Считается, что цитопротекторное действие нитрита в условиях

ишемии/реперфузии (гипоксии-реоксигенации) связано с формированием ДНКЖ в митохондриях [Dungel et al., 2015].

Образованием ДНКЖ в митохондриях объясняют способность нитрита оказывать цитопротекторное действие после ишемии/реперфузии в клеточных моделях и ряде органов, включая сердце, головной мозг, почки, легкие и печень. Механизм этого эффекта заключается в *S*-нитрозилировании критического остатка цистеина в комплексе I митохондрии, благодаря чему ингибируется ферментативная активность комплекса I и как следствие снижается продукция АФК и предотвращается развитие апоптоза. Было показано, что митохондриальные ДНКЖ участвуют в нитрит-опосредованной защите после ишемии/реперфузии [Dungel et al., 2015]. В работе [Thomas et al., 2018] продемонстрировано, что образование ДНКЖ происходит одновременно с повреждением митохондрий, вызванным NO. Этот факт свидетельствует, что образование ДНКЖ в митохондриях является физиологически значимым процессом.

Несмотря на то, что эритроциты лишены митохондрий в этих клетках также может происходить восстановление нитрита до NO. В условиях гипоксии дезоксигемоглобин взаимодействует с нитритом с образованием оксида азота и метгемоглобина [Huang et al., 2005; Patel et al., 2011]. Кроме этого, нитритредуктазной активностью в эритроцитах обладает ксантиноксидаза. Образующийся в этих реакциях NO может участвовать в формировании *S*-нитрозотиолов [Patel et al., 2011; Wajih et al., 2016]. Миоглобин также катализирует нитритредуктазную реакцию, которая имеет значение для функционирования сердечной и скелетных мышц при гипоксии [Кулева, Красовская, 2016].

В настоящее время нитрит рассматривают как возможный фармакологический агент для профилактики и лечения острой фазы поражения, вызванного ишемией-реперфузией [Ingram et al., 2013; Kobayashi, Murata, 2018]. В этом качестве также могут быть использованы и GS-ДНКЖ [Pisarenko et al., 2019].



**Рисунок 1.2.8. Динитрозильные комплексы железа как посредники биологической активности нитритов в организме.**

### 1.2.3. Нитроксильный анион (нитроксил)

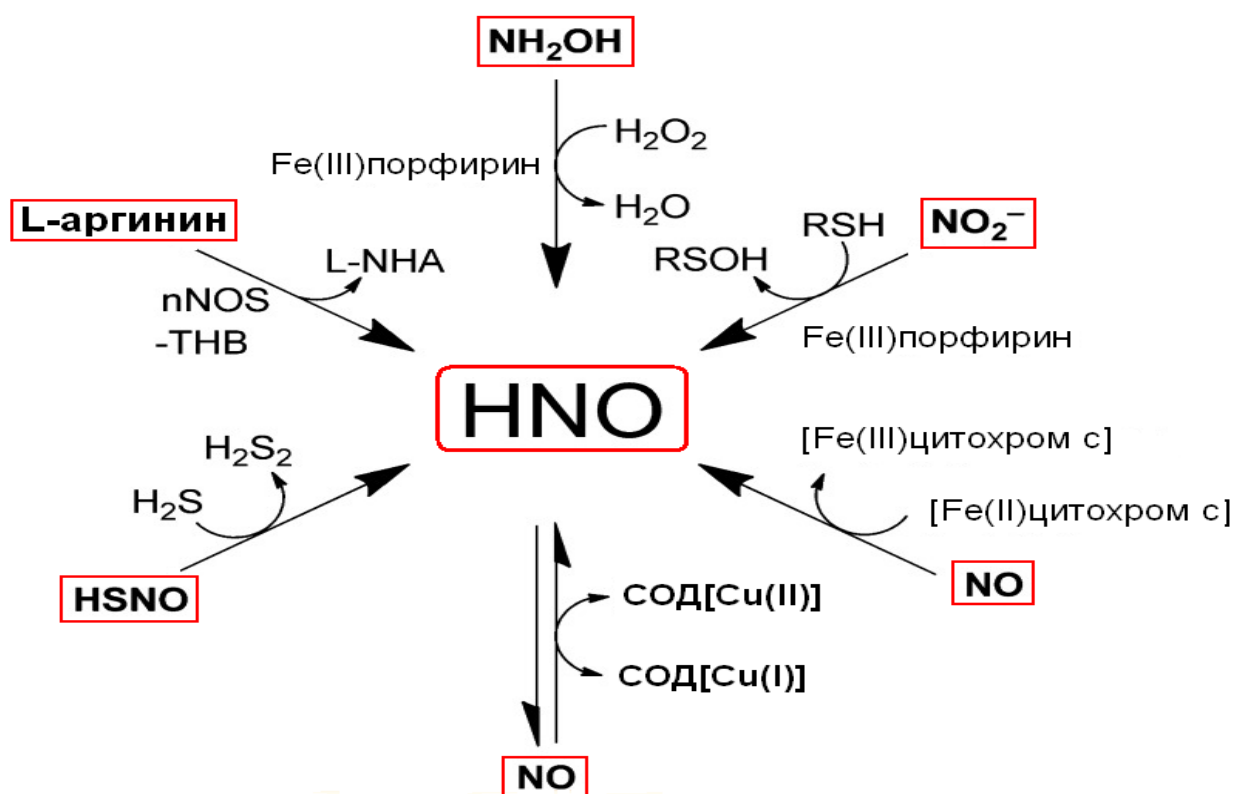
#### *Образование нитроксильного аниона (нитроксила)*

Нитроксил (HNO) – продукт одноэлектронного восстановления и протонирования оксида азота. Эту молекулу также называют оксонитратом водорода, нитрозилгидридом и азаноном (IUPAC name azanone) [Miranda et al., 2005]. Нитроксил находится в равновесии с нитроксильным анионом (NO<sup>-</sup>) [Fukuto et al., 2005]. Однако при физиологических условиях нитроксил преимущественно существует в виде HNO, поскольку превращение HNO в NO<sup>-</sup> запрещено по спине [Miranda et al., 2005; Shafirovich et al., 2002]. Нитроксил обладает высокой биологической активностью, во многом перекрывающейся с действием NO или ONOO<sup>-</sup> [Fukuto et al., 2009].

В последние годы наблюдается повышенный интерес к биологии и химии HNO, хотя до сих пор не ясно существуют ли ферментативные пути образования этой молекулы. Обсуждается участие NO-синтаз в этом процессе [Wrobel et al., 2014]. Так, в отсутствие окислительно-восстановительного

кофактора тетрагидробиоптерина NO-синтаза катализирует образование HNO из *L*-аргинина. На рисунке 1.2.9. представлены и другие возможные пути биосинтеза нитроксила.

Нитроксила имеет короткое время жизни из-за быстрой димеризации в гипонитритную кислоту, которая далее распадается с образованием  $N_2O$  и  $H_2O$  ( $k = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Shafirovich et al., 2002]. Поэтому в исследовательских целях и в фармакологии используют молекулы-доноры, которые, разлагаясь, выделяют HNO в ответ на внешние стимулы, такие как pH, температура, свет и др. [DuMond, King, 2011; Fukuto, 2019].



**Рисунок 1.2.9. Возможные пути биосинтеза нитроксила (HNO).** СОД – супероксиддисмутаза, *L*-NHA – *N*-гидрокси-*L*-аргинин, nNOS – нейрональная NO-синтаза, THB – тетрагидробиоптерин. Модифицировано по [Wrobel et al., 2014].

Донорами HNO являются производные гидроксиламина с хорошо уходящими группами, присоединенными к атому азота (соль Ангели, кислота Пилоти), и нитрозосоединения ( $X-N=O$ , где X – уходящая группа) [DuMond, King, 2011]. Наиболее часто используемые доноры HNO – соль Ангели или

триоксодинитрат натрия ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) и кислота Пилоти (*N*-гидроксибензолсульфонамид). В настоящее время эти соединения хорошо себя зарекомендовали в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, алкоголизма и рака [Fukuto, 2019]. Особенно перспективно их использование в качестве кардиопротекторных средств, поскольку они обладают гипотензивным действием, а также способны улучшать сократимость миокарда и ингибировать его гипертрофию [Flores-Santana et al., 2011; Andrews et al., 2015; Keceli et al., 2019]. В отличие от органических нитратов, используемых в медицине в качестве доноров NO, вызывающих вазодилатацию, к донорам нитроксила не вырабатывается резистентность [Andrews et al., 2009, 2015]. Данный факт можно объяснить тем, что HNO и  $\text{NO}^-$  не реагируют с супероксидом, тогда как NO быстро утилизируется в реакции с этим анион-радикалом. Также известно, что HNO/ $\text{NO}^-$  предотвращают ангиогенез в раковой опухоли и вызывают апоптоз раковых клеток [Flores-Santana et al., 2011; Lin et al., 2012; Sun et al., 2020].

#### ***Антиоксидантные и прооксидантные свойства нитроксила***

Терапевтический потенциал HNO во многом определяется его антиоксидантными и прооксидантными свойствами [Shoman, Aly, 2016]. Инверсия антиоксидантных свойств в прооксидантные происходит при увеличении кислорода в реакционной среде.

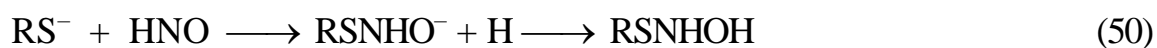
В литературе имеются данные об антиоксидантном и антирадикальном действии нитроксила. Так, в условиях окислительного стресса HNO повышает выживаемость дрожжевых клеток, дефицитных по коэнзиму Q, и ингибирует ПОЛ [Lopez et al., 2007], что, по-видимому, обусловлено восстановлением свободных радикалов липидов. В то же время установлено, что доноры нитроксила соль Ангели и кислота Пилоти гасят реакционноспособные радикальные интермедиаты, образующиеся в ходе перекисного окисления в гомогенизированном препарате сердечной мышцы крыс. Кроме того, в результате окисления HNO образуется NO, который, как известно, тоже обладает антиоксидантным действием и может купировать реакции ПОЛ

[Hogg, Kalyanaraman, 1999; Hogg et al., 1993; Wink et al., 1993; Gudkov et al., 2007]. Нитроксил может снижать продукцию супероксида как за счет ингибирования NADPH-оксидазы [Lin et al., 2012], так и за счет ингибирования активности I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий [Shiva et al., 2004].

Однако, HNO, как NO и другие одноэлектронные антиоксиданты (аскорбат и токоферол) может быть источником свободных радикалов. Нитроксил реагирует с O<sub>2</sub> с образованием ONOO<sup>-</sup>. Эта реакция не контролируется СОД, в отличие от образования пероксинитрита в реакции NO с супероксидом. Нитроксил в реакции с NO образует гипонитритный радикал. К тому же HNO восстанавливает ионы меди [Nelli et al., 2000], которые могут катализировать ПОЛ. Действие HNO в качестве антиоксиданта или прооксиданта зависит от его концентрации и окислительно-восстановительных условий внутри клетки [Shoman, Aly, 2016].

Помимо непосредственного антиоксидантного действия HNO может влиять на неферментативное гликирование белков активными карбонильными соединениями за счет взаимодействия с тиоловыми остатками и гемовыми группами белка [Smulik-Izydorczyk et al., 2021]. В биологических средах HNO является как электрофилом, окисляющим тиолы, так и нуклеофилом, который может координировать и восстанавливать ионы металлов [Fukuto, Carrington, 2011].

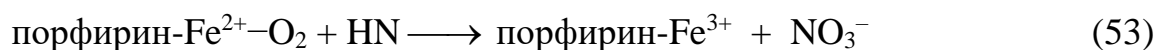
Тиолы составляют главную биологическую мишень HNO [Donzelli et al., 2006]. Скорость этой реакции значительно превышает скорость димеризации HNO [Miranda et al., 2005]. Реакция между HNO и тиолами ( $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) приводит к образованию интермедиата *N*-гидроксисульфенамида (реакция 50), который нестабилен и в присутствии избытка тиола или вицинального белкового тиола превращается в дисульфид и гидроксилламин (реакция 51). *N*-гидроксисульфенамид может спонтанно изомеризоваться в сульфенамид (реакция 52), который представляет собой необратимую модификацию тиола [Smulik-Izydorczyk et al., 2021].



С анионной формой тиолов – тиолатом ( $\text{RS}^-$ ) нитроксил реагирует предпочтительнее, чем с протонированной ( $\text{RSH}$ ). Это означает, что реакционная способность  $\text{HNO}$  по отношению к тиолам определяется  $\text{pK}_a$   $\text{SH}$ -группы и сильно зависит от  $\text{pH}$  [Smulik-Izydorczyk et al., 2021]. Благодаря этому нитроксил может действовать как сайт-специфический модификатор тиоловых групп белков. Механизм этой реакции заключается в атаке нуклеофильной серы электрофильным атомом азота  $\text{HNO}$ . По механизму эта реакция аналогична реакции тиолов с карбонильными соединениями, приводящей к образованию гемитиоацеталей [Lienhard, Jencks, 1966]. Поэтому можно предположить, что  $\text{HNO}$  конкурирует с карбонильными соединениями за реакционноспособные белковые тиолы.

Другим аспектом химии  $\text{HNO}$ , важным для его биологической активности, является его способность вступать в реакцию и/или образовывать координационные комплексы с металлопротеинами, в частности с гемопroteинами [Bari et al., 2003]. В отличие от  $\text{NO}$ , связывание  $\text{HNO}$  с окисленным гемовым железом ( $> 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) более благоприятно, чем с восстановленным ( $< 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Bari et al., 2003].

Реакция  $\text{HNO}$  с оксигемами (порфирин- $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ ) протекает с константой скорости  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Miranda et al., 2004; Flores-Santana et al., 2009]. В результате этой реакции образуется окисленный гем и нитрат:



Также существует вероятность, что  $\text{HNO}$  восстанавливается до  $\text{H}_2\text{NO}$  [Miranda et al., 2004; Flores-Santana et al., 2009]:



Антиоксидантное действие нитроксила также может быть обусловлено молекулой NO, которая образуется либо в результате окисления HNO двухэлектронными окислителями, такими как флавинадениндинуклеотид (FAD), либо в результате восстановительного нитрозилирования гемопротеидов.

Еще один потенциальный механизм антиоксидантного действия нитроксила связан с формированием с их участием координационных комплексов с железом [Farmer, Sulc, 2005]. В наших исследованиях было показано, что HNO/NO<sup>-</sup>, но не NO, участвует в образовании динитрозильных комплексов железа, содержащих в качестве лигандов карнозин (бета-аланил-L-гистидин) и эрготионеин (бетаин-2-тиогистидин) [Shumaev et al., 2017]. В ряде работ продемонстрировано, что нитрозильные комплексы гемового и негемового железа являются эффективными антиоксидантами [Shumaev et al., 2008; 2019; Kosmachevskaya et al., 2021; Шумаев с соавт., 2004, 2021].

Принимая во внимание тот факт, что мембраны являются благоприятной средой для HNO [Espey et al., 2002], можно предположить, что наибольшая защита от окислительного повреждения будет по отношению к мембранным белкам и липидам.

#### **1.2.4. Экзогенные доноры оксида азота и нитроксила**

Сейчас имеется большое количество экзогенных доноров NO и HNO (таблица 1.2.1.), способных в ходе метаболических процессов генерировать оксид азота или его производные [Carvalho, 2020]. Наиболее известные доноры оксида азота и нитроксила представлены в таблице 1.2.1 и на рисунке 1.2.10. Эти соединения применяют в медицине для усиления кровоснабжения миокарда при ишемической болезни сердца, стенокардии и инфаркте миокарда, и других патологиях. Большая часть этих соединений представляет собой органические нитриты. Также, в последние годы становятся популярны синтетические доноры оксида азота: NONOates, N-нитрозамины, сиднонимины [Wang et al., 2002].



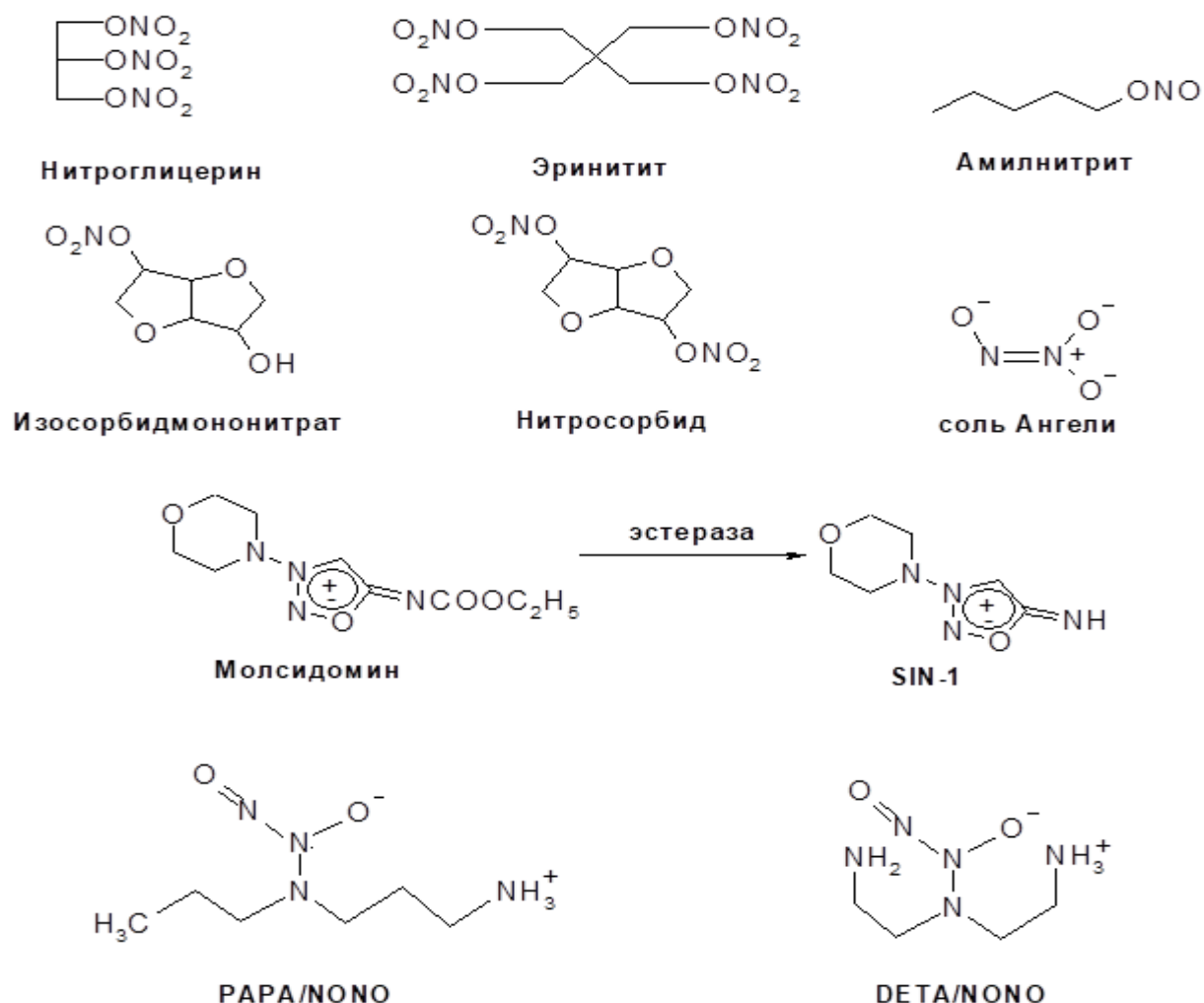
**Таблица 1.2.1. Доноры оксида азота и нитроксила.**

Доноры NO	Доноры HNO
Органические нитраты (нитроглицерин, нитросорбид, изосорбида мононитрат, амилнитрит, эринитит)	На основе первичных аминодiazениумдиолатов (Angeli's salt)
S-нитрозотиолы (нитрозоцистеин, нитрозоглутатион)	На основе гидроксиламина (Кислота Пилоти)
Диазениумдиолаты (NONOates)	На основе нитрозосоединений
Сиднонимины (молсидомин)	На основе гидроксамовой кислоты
Доноры на основе металлосоединений	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Железонитрозильные комплексы (ДНКЖ и др.)</li> <li>• Нитропруссид натрия (SNP)</li> <li>• Нитропруссид натрия, закрепленный в наночастицах на основе диоксида кремния</li> <li>• Полипиридин рутений-нитрозильные комплексы</li> </ul>	
Фуроксаны высвобождают NO• / HNO в физиологической среде в результате реакции с тиолами	

Молсидомин относится к группе сиднониминов и в организме является предшественником SIN-1 (3-морфолинсиднонимина), при распаде которого происходит образование пероксинитрита. Поэтому молсидомин и SIN-1 используются в экспериментальных модельных системах, в качестве источника ONOO<sup>-</sup>. Однако, собственными эффектами могут также обладать редокс-активные интермедиаты распада сиднониминов.

В качестве источников NO в различных исследованиях часто используются диазениумдиолаты (PAPA/NONO, DETA/NONO и др.). Эти

соединения разрушаются в водных растворах при физиологических и более низких значениях рН. Кинетика распада характеризуется первым порядком, причём на одну молекулу донора выделяется две молекулы NO [Aga, Hughes, 2008].



**Рисунок 1.2.10. Синтетические доноры оксида азота, используемые в медицинской практике.**

В последние годы активно изучаются и создаются гибридные препараты, включающие донор NO и противомикробное соединение. Поскольку NO в высоких концентрациях способен оказывать цитотоксическое действие, то его доноры сочетают с различными антимикробными соединениями для получения синергетического эффекта. Например, изучено антимикробное действие цефалоспорин-связанных диазениумдиолатов. Эти пролекарства состоят из цефалоспорина – антибиотика, содержащего  $\beta$ -

лактамное кольцо, связанное с диазениумдиолатом. Такой гибридный препарат стабилен и высвобождает NO только в области заражения бактериями при расщеплении  $\beta$ -лактамного кольца бактериальными ферментами  $\beta$ -лактамазами [Allan, 2017].

В настоящее время ведется активный поиск новых доноров NO и HNO с целью создания лекарственных препаратов нового поколения с улучшенным спектром активности и сниженными побочными эффектами по сравнению с уже используемыми клиническими препаратами. При разработке новых препаратов большое внимание уделяется их физиологичности. В связи с этим несомненным преимуществом обладают препараты на основе S-нитрозотиолов и динитрозильных комплексов железа. Эти соединения изначально присутствуют в организме и поэтому имеют низкую токсичность и низкий диапазон терапевтических доз.

### **1.3. Карбонильный стресс в биологических системах**

#### **1.3.1. Карбонильный стресс и активные карбонильные соединения**

Согласно статьям, опубликованным на <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, термин «карбонильный стресс» активно начал использоваться в последние 20 лет. Принимая во внимание количество статей, а их число достигает несколько тысяч, интерес к этой теме постоянно растет. Под карбонильным стрессом по аналогии с окислительным стрессом подразумевают возникновение дисбаланса между образованием активных карбонильных соединений (АКС) и их удалением. В итоге этот дисбаланс приводит к увеличению уровня АКС и скорости реакций неферментативного гликирования.

Процесс неферментативного гликирования был впервые исследован французским биохимиком и врачом Луи Камиль Майаром в 1912 г. и получил название реакция Майара. Реакция Майара – это не единичная реакция, а целый комплекс последовательно и параллельно идущих процессов. Первая стадия этой реакции – спонтанное взаимодействие сахара с аминокетонами

аминокислот и аминокислотных остатков белков с образованием оснований Шиффа, которые далее претерпевают перегруппировку Амадори [Lin et al., 2018]. Продукты Амадори разлагаются с образованием АКС, а именно метилглиоксаля (MG), 3-дезоксиглюкозона и глиоксаля. Процессы и реакции, подобные тем, которые исследовал Майар *in vitro*, протекают во всех живых организмах от бактерий до человека [Космачевская с соавт., 2018].

Активные карбонильные соединения также, как и активные формы кислорода и азота относятся к соединениям, способным неферментативно модифицировать биомолекулы (белки, липиды, нуклеиновые кислоты). Разные авторы по-разному определяют пул АКС, обычно к ним относят альдегиды и кетоны, содержащие электрофильный углерод карбонильной группы ( $>C=O$ ), способный вступать в реакцию с нуклеофильным азотом аминокислот, пептидов и гуаниновых оснований и образовывать с ними основания Шиффа [Rabbani et al., 2012]. Карбонильный стресс также могут вызывать высокие концентрации сахаров (глюкозы, дезоксиглюкозы, фруктозы, рибозы), триозофосфатов и некоторые формы липидов. Практически вся глюкоза в организме находится в глюкопиранозной форме и имеет стабильную кольцевую структуру, поэтому ее реакционная способность ниже по сравнению с другими альдогексозами [Bunn, Higgins, 1981]. Благодаря этому клетка может накапливать глюкозу в высокой концентрации, сохраняя при этом целостность внутриклеточных белков.

### 1.3.2. Конечные продукты гликирования

В результате действия АКС образуются конечные продукты гликирования (КПГ или AGEs), ассоциированные с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Помимо аминокислот мишенью действия АКС являются тиоловые группы белков, пептидов, аминокислот и аминокислотных фосфолипидов. Также АКС могут активно реагировать с гуанидиновой группой остатков аргинина, которая часто встречается в сайтах распознавания лигандов и субстратов в активных центрах рецепторов и ферментов.

Вследствие этого модификация гликированием приводит к нарушению функционирования клеток и тканей [Zeng, Davies, 2005].

Восстановленные сахара до присоединения к аминогруппе могут подвергаться реакциям дегидратации, окисления и фрагментации. Образующиеся в этих процессах реакционноспособные промежуточные продукты, часто представляют собой дикарбонильные соединения –  $\alpha$ -кетоальдегиды. Относительно высокие уровни  $\alpha$ -кетоальдегидов образуются в живых системах при фрагментации интермедиатов гликолиза [Kosmachevskaya et al., 2021].

В настоящее время активно изучаются реакции гликирования порядка 15 дикарбонильных соединений, образованных из моносахаридов. Учитывая стереоизомеры, количество  $\alpha$ -оксоальдегидов и  $\alpha,\beta$ -дикетонов может быть гораздо больше. Эти промежуточные продукты в десятки тысяч раз более реакционноспособны, чем глюкоза, поэтому даже в низких концентрациях,  $\alpha$ -оксоальдегиды проявляют сильную гликирующую активность при физиологических условиях [Thornalley et al., 1999].

Особый интерес среди АКС вызывает метилглиоксаль (MG) – наиболее реакционноспособное дикарбонильное соединение. Метилглиоксаль образуется при фрагментации триозофосфатов, а также при метаболизме кетоновых тел и деградации треонина. Примерно 0,1–0,4% гликолитического потока направляется на синтез MG [Gonçalves et al., 2018; Phillips, Thornalley, 1993]. Например, эндиолфосфат в реакции с триозофосфатизомеразой может выходить из активного центра фермента и быстро превращаться в MG. А инактивация гликолитической триозофосфатизомеразы или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы повышает уровень триозофосфатов, что в свою очередь, усиливает образование метилглиоксаля [Muronetz et al., 2019; Krautwald et al., 2010].

У здоровых людей концентрация MG составляет в плазме 50–150 нМ и в тканях 1–4 мкМ. Концентрация MG в плазме и крови больных диабетом  $742 \pm 141$  и  $409 \pm 131$  нмоль/л соответственно, в контрольной группе  $520 \pm 42$  и

338±62 нмоль/л [Rabbani et al., 2016]. В эритроцитах больных диабетом концентрация MG 3,6 ±2,3 мМоль/л, в контрольной группе 1,4 ±0,2 мМоль/л [Thornalley et al., 1989].

Еще одно известное дикарбонильное соединение – глиоксаль. Глиоксаль образуется как продукт реакции перекисного окисления ПНЖК, катализируемой переходными металлами [Loidl-Stahlhofen et al., 1994; Brings et al., 2017]. В результате перекисного окисления липидов образуются и другие АКС: 4-гидрокси-2-ноненаль, 4-оксо-2-ноненаль, малоновый диальдегид, акролеин.

Метаболизм фруктозо-3-фосфата в полиоловом пути приводит к образованию еще одного реакционноспособного карбонильного соединения – 3-дезоксиглюкозона [Gugliucci, 2017]. Доказано, что глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозон наиболее активные гликирующие агенты и предшественники КПП в живых системах.

Конечные продукты гликирования по происхождению можно разделить на две основные группы: эндогенные и экзогенные. Большинство эндогенных КПП образуются спонтанно и накапливаются в организме в физиологических условиях, а также в результате старения. Источником экзогенных КПП обычно являются продукты питания. В продуктах животного происхождения с высоким содержанием жира и белка количество КПП выше, чем в продуктах растительного происхождения с высоким содержанием воды, антиоксидантов и витаминов. Термическая обработка пищи – это еще один ключевой фактор, определяющий содержание КПП в продуктах питания. Термическая обработка повышает концентрацию КПП в 10–100 раз [Uribarri et al., 2010]. Голдберг и др. исследовали содержание КПП в 250 видах продуктов, приготовленных различными способами. Самые высокие уровни КПП были обнаружены в жареных и приготовленных на гриле продуктах, за которыми следовала запеченная пища, а самые низкие уровни КПП были обнаружены в вареных продуктах [Goldberg et al., 2004].

На сегодняшний день в тканевых белках идентифицировано более 20 КПП, включая карбоксиметиллизин, карбоксиэтиллизин, пирролин, пентозидин, имидазолины (имидазолин А и имидазолин В) и глюкозепан. Эти КПП подразделяются на три группы в соответствии с их химическими характеристиками [Kosmopoulos et al., 2019]: (1) несшитые нефлуоресцирующие продукты; (2) сшитые нефлуоресцирующие продукты; (3) сшитые флуоресцирующие продукты. Флуоресцирующие КПП составляют большую часть КПП и являются удобными маркерами для измерения и оценки общего количества КПП в организме [Villa et al., 2017].

Еще одна классификация КПП связана с их молекулярной массой. Высоко- и низкомолекулярные КПП по-разному действуют на организм, что выражается во взаимодействии с рецепторами, в скорости деградации желудочно-кишечными ферментами, а также в скорости протеолиза и всасывания в кровоток [Deluyker et al., 2017].

Эритроциты могут испытывать карбонильный стресс либо подвергаясь действию глюкозы и ее метаболитов гликотоксинов (глиоксаля и метилглиоксаля) со стороны плазмы, либо в результате собственной внутриклеточной генерации MG [Kosmachevskaya et al., 2021]. В первом случае гликирующие агенты вырабатываются в организме при различных метаболических нарушениях (диабетической гипергликемии, уремии, кетогенезе) или попадают в кровь с пищей. Доказано, что основная причина повышения концентрации MG в крови – гипергликемия. Зачастую MG образуется в результате неферментативного разложения интермедиатов гликолиза – триозофосфатов. Однако MG также образуется при нарушении катаболизма аминокислот и окисления ацетона. Повышенные уровни MG в плазме также могут быть за счет деятельности кишечных бактерий [Shin et al., 2020]. К повышенным уровням MG в эритроцитах может также приводить инфицирование малярийным плазмодием [Vander Jagt et al., 1990].

Формирование КПП является сложным процессом, который можно разделить на два основных этапа. На первом этапе, в течение нескольких часов

восстанавливающие сахара, содержащие карбонильные группы, обратимо реагируют со свободными аминогруппами белков и нуклеиновых кислот с образованием нестабильных оснований Шиффа. Скорость этой реакции зависит от концентрации восстанавливающего сахара. Через несколько недель, основания Шиффа в результате спонтанной внутримолекулярной перегруппировки превращаются в относительно стабильные ковалентно связанные продукты Амадори, также известные как продукты раннего гликирования. Также, небольшая часть продуктов Амадори может быть преобразована в КППГ путем необратимого окисления или гидролиза в реакциях, известных как реакции пути Ходжа [Ott et al., 2014]. Некоторые продукты Амадори путем дегидратации, окислительного крекинга или циклизации могут быть трансформированы в соединения – предшественники КППГ, такие как глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозон. Эти активные карбонильные соединения ковалентно связываются с долгоживущими белками и структурными компонентами матрикса соединительной ткани или базальной мембраны с образованием стабильных КППГ.

Неферментативное гликирование белков *in vivo* изменяет их вторичную и третичную структуру, модифицирует боковые группы аминокислотных остатков, приводит к межсубъединичным и межбелковым сшивкам [Ahmed, 2005]. Нуклеиновые кислоты и липиды тоже подвергаются модификации, при этом нарушается их структура и химические свойства [Houben et al., 2008]. В конечном итоге нарушение функционирования белков, нуклеиновых кислот и липидов негативно сказывается на работе клетки, что приводит к ее повреждению или гибели.

Действию АКС подвергаются не только внутриклеточные белки, а также долгоживущие белки внеклеточного матрикса, например, коллаген и эластин. В результате гликирования эти белки становятся более жесткими и менее восприимчивыми к протеолитическому расщеплению [Zieman et al., 2004]. Снижение эластичности матрикса вследствие накопления большого



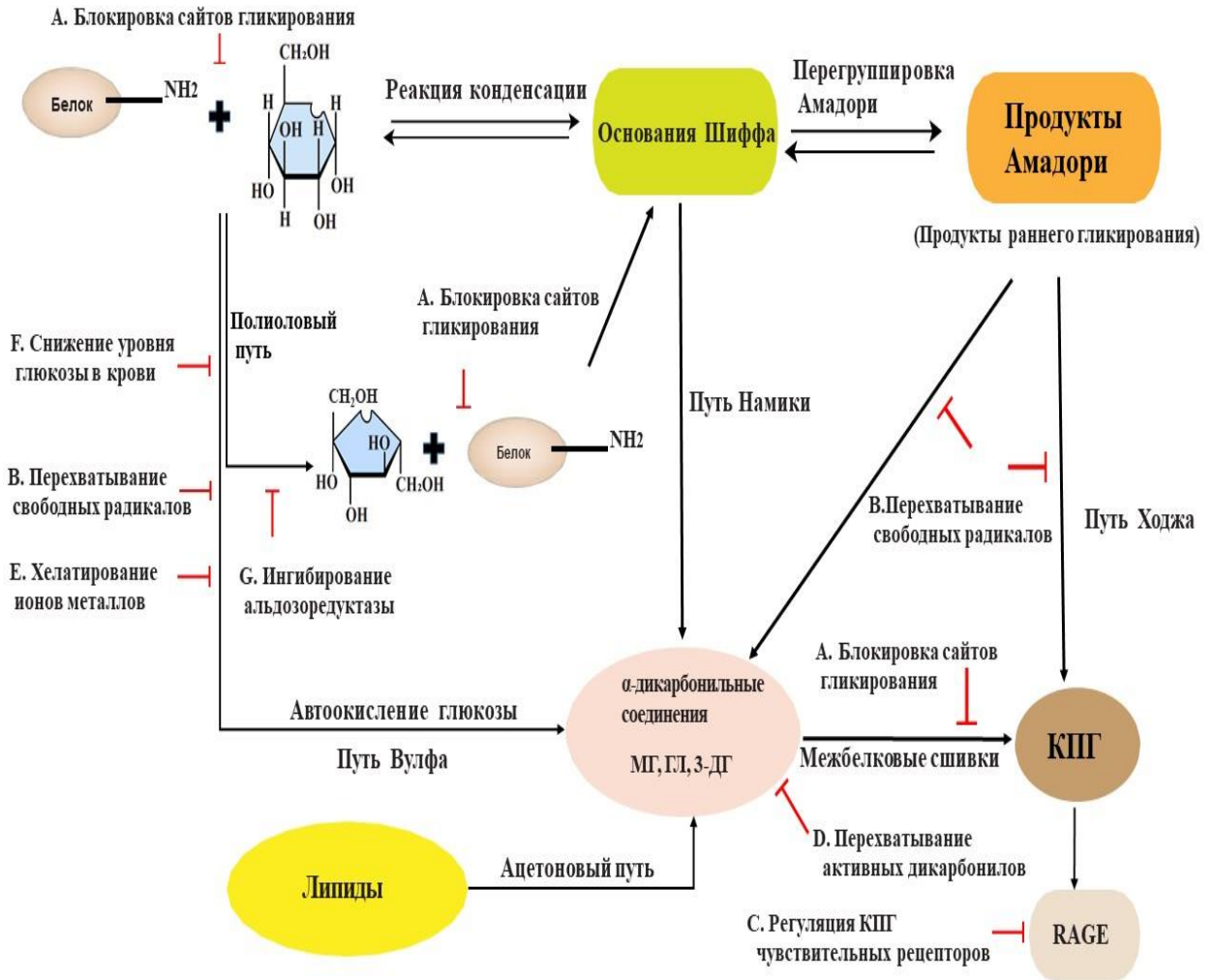
количества КПП и межбелковых сшивок вносит вклад в развитие целого ряда возрастных патологий: нарушение целостности стенок сосудов, повреждение тканей сердца, онкологические и нейродегенеративные заболевания. На молекулярном уровне увеличение жёсткости матрикса вызывает нарушения взаимодействия матрикса с клетками, приводит к дисфункции иммунной системы, а также способствует развитию хронического воспаления [Burr et al., 2021].

### 1.3.3. Анти- и дегликирующие стратегии

Как пищевые, так и тканевые КПП вносят свой вклад в патогенез различных заболеваний. Лучший способ борьбы с образованием КПП – регулирование гомеостаза глюкозы. Защиту от осложнений, вызванных КПП, также обеспечивают, физические нагрузки, употребление антиоксидантов и соединений, препятствующих воздействию КПП. Кроме этого, можно ограничить потребление КПП с пищей, снижая содержание в пищевом рационе богатых сахаром продуктов, а также жирного мяса, жирных молочных продуктов и твердых жиров.

В живых системах предусмотрены механизмы борьбы с карбонильным стрессом и его последствиями. Механизмы, препятствующие образованию КПП, можно разделить на семь групп (рисунок 1.3.1.): 1) блокирование сайтов гликирования белков, 2) удаление свободных радикалов, 3) регуляция рецепторов КПП (RAGEs), 4) улавливание активных дикарбонильных соединений, 5) хелатирование ионов металлов, 6) ингибирование альдозоредуктазы, 7) снижение уровня глюкозы в крови.

Согласно последним работам, скорость образования КПП возрастает не только в условиях диабетической гипергликемии, но и при атеросклерозе, нефропатии, возрастных заболеваниях и других патологиях.



**Рисунок 1.3.1. Пути формирования конечных продуктов гликирования в организме.** В результате реакции глюкозы с белками образуются основания Шиффа, которые подвергаются перегруппировке и расщеплению с образованием продуктов Амадори. Некоторые продукты Амадори превращаются в КПГ, а другие окисляются и расщепляются до АКС. АКС реагируют с белками с образованием КПГ. Кроме того, автоокисление глюкозы, окислительное расщепление основания Шиффа, расщепление продукта Амадори и перекисное окисление липидов могут продуцировать образование АКС, которые также продуцируют дополнительные порции КПГ. **А.** Блокировка сайтов гликирования белков ингибирует образование КПГ. **В.** Удаление свободных радикалов снижает образование активных дикарбонильных соединений и дополнительно ингибирует образование КПГ. **С.** Регуляция передачи сигналов от рецептора КПГ ингибирует

воспалительную реакцию и образование АФК, снижая продукцию КПП. **Д.** Захват активных дикарбонильных соединений способствует снижению концентрации соединений-предшественников КПП и образования КПП. **Е.** Хелатирование ионов редокс-активных металлов (железо и медь) снижает скорость окисления углеводов и дополнительно снижает образование КПП. **Ф.** Снижение уровня глюкозы уменьшает скорость неферментативного гликирования. **Г.** Ингибирование на стадии альдозоредуктазы снижает образование фруктозы и уменьшает продукцию КПП.

### *Антигликирующие синтетические препараты*

Некоторые химически синтезированные препараты показали свою эффективность в качестве антигликирующих веществ. Например, аминогуанидин, первый препарат с клиническим терапевтическим потенциалом, ингибирует образование КПП, блокируя карбонильную группу продуктов Амадори за счет реакций нуклеофильного присоединения, тем самым предотвращая их дальнейшую перегруппировку. Аминогуанидин также может связываться с  $\alpha$ -дикарбонилами (глиоксалем и метилглиоксалем) с образованием триазинов, что препятствует превращению продуктов Амадори в КПП [Schalkwijk et al., 2012]. Ингибировать образование КПП могут ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, антагонисты рецепторов ангиотензина, метформин и другие гипогликемические препараты [Luevano-Contreras et al., 2010]. Метформин снижает уровень глюкозы в крови и вызывает активацию глиоксалазы-I (GLO-I), которая участвует в детоксикации реакционноспособных  $\alpha$ -кетоальдегидов.

Для борьбы с КПП разработаны синтетические вещества – разрушители поперечных углерод-углеродных связей в продуктах гликирования: Alt -711, Alt-462, Alt-486, бромид N-фенацетилтиазолия (РТВ), Alt-TRC4186 [Vlassara et al., 2011].

Поскольку многие негативные эффекты КПП сопряжены с активацией рецепторов КПП, то еще одна стратегия борьбы с действием КПП заключается

в использовании нейтрализующих антител к этим рецепторам [Brings et al., 2017].

Все упомянутые выше соединения неизбежно вызывают побочные реакции и поэтому не могут быть использованы в течение длительного времени.

### *Антигликирующие природные соединения*

На сегодняшний день во многих исследованиях показано, что природные соединения животного и растительного происхождения являются ингибиторами образования КППГ или являются структурной основой для разработки таких ингибиторов. Природные соединения – ингибиторы образования КППГ, можно разделить на шесть классов в зависимости от их химической структуры: 1) полифенолы, 2) полисахариды, 3) терпеноиды, 4) витамины, 5) алкалоиды, 6) пептиды. Эти соединения блокируют образование КППГ посредством нескольких механизмов. Это удаление свободных радикалов, хелатирование редокс-активных ионов металлов, улавливание АКС, экранирование участков гликирования белков, а также снижение уровня глюкозы в крови.

Наиболее широко изучено антигликирующее действие полифенолов. Однако полифенолы еще не нашли широкого применения в клинической медицине, потому что активно метаболизируются в организме, не достигая терапевтических мишеней.

В настоящее время известно несколько природных соединений с антиоксидантными свойствами, проявляющие хорошую ингибирующую активность по отношению к образованию КППГ и при этом обладающие минимальными токсическими эффектами [Huang et al., 2016]. Ингибируют гликирование такие природные антиоксиданты как витамин С и Е,  $\alpha$ -токоферол, ниацинамид, пиридоксаль, липоевая кислота, а также хелатирующие агенты (селенит натрия, рибофлавин) и микроэлементы цинк и марганец [Elosta et al., 2012]. Например, добавка в пищу альфа-липоевой кислоты предотвращала гликирование коллагена у крыс, получавших

фруктозу [Gkogkolou et al., 2012]. Odetti с соавторами показали, что витамины С и Е, а также комбинация *N*-ацетилцистеина с таурином и оксеретином оказывают антигликирующее действие *in vivo*. Сообщалось, что *N*-ацетилцистеин ингибирует АФК-зависимую активацию фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, тем самым предотвращая негативные процессы, опосредованные КПП [Odetti et al., 2003].

### ***Ферментативная детоксикация АКС***

Живым системам важно поддерживать концентрацию АКС на определенном уровне. Поэтому кроме низкомолекулярных антигликирующих соединений все организмы имеют ферменты детоксикации АКС, которые представлены глиоксалазной системой, альдозоредуктазой, карбонилредуктазой и альдегиддегидрогеназой.

Глиоксалазная система – основной механизм защиты от токсичных оксоальдегидов, включает два фермента: глиоксалазу-I (GloI, EC 4.4.1.5: *S-D*-лактоилглутатионлиаза) и глиоксалазу-II (GloII, EC 3.1.2.6: гидроксацилгидролаза). GLO-I, используя в качестве кофактора GSH, катализирует изомеризацию гемитиоацетала в *S-D*-лактоил-глутатион, который затем гидролизуется GLO-II до *D*-лактата с высвобождением восстановленного глутатиона. GLO-I также катализирует изомеризацию глиоксаля, фенилглиоксаля и гидроксипировиноградного альдегида [Maessen et al., 2015]. Альдозоредуктаза 2 в присутствии GSH восстанавливает MG до лактальдегида благодаря NADPH-зависимой реакции. Если нарушается функция GLO-I, например, при низкой концентрации глутатиона, то альдозоредуктаза 2 катализирует превращение MG в ацетол. Ацетол спонтанно превращается обратно в MG в результате реакции окисления или диспропорционирования, что приводит к запуску нежелательного футильного цикла. Глиоксалазная система и альдозоредуктаза метаболизируют более 99% образующегося MG [Rabbani et al., 2016].

В водном растворе MG является плохим субстратом для альдегиддегидрогеназы 1 (ALDH1) и альдегиддегидрогеназы 2 (ALDH2).

Однако MG является подходящим субстратом для альдегиддегидрогеназы 9 (ALDH9), которая окисляет его до пирувата. Карбонилредуктаза, NADPH-зависимая оксидоредуктаза, катализирует восстановление альдегидов и кетонов до первичных и вторичных спиртов соответственно [Malatkova et al., 2010].

#### ***Блокирование участков гликирования белков***

Некоторые природные соединения, связываясь с определенными сайтами белка, ингибируют неферментативное гликирование. Как правило, они спонтанно связываются с белками посредством водородных связей или сил Ван-дер-Ваальса [Arfin et al., 2018]. К таким соединениям относятся феруловая кислота, изоферуловая кислота, кофейная кислота, коричная кислота, антоцианин-3-глюкозид. С помощью молекулярного докинга было показано, что кофейная кислота связывается с Arg185 и Tyr137 бычьего сывороточного альбумина через водородные связи, тем самым стабилизируя структуру белка и предотвращая его гликирование [Cao et al., 2019].

#### ***Улавливание активных дикарбонильных соединений***

Многие природные соединения способны эффективно перехватывать  $\alpha$ -дикарбонилы и ингибировать образование КПП дозозависимым образом. Химические свойства полифенолов, а именно наличие гидроксильных групп и бензольных колец, позволяют им выступать в качестве перехватчиков КПП [Navarro et al., 2015]. Например, флоретин образует специфические аддукты с метилглиоксалем и глиоксалем. Куркумин напрямую захватывает MG, образуя аддукты куркумин-MG. Кроме того, дипептид карнозин может улавливать карбонильные соединения и ингибировать образование КПП [Song et al., 2021].

Аминогуанидин известен как один из первых ингибиторов образования КПП. Механизм его действия включает перехват активных промежуточных продуктов, образующихся в результате реакции Майяра. На животных моделях сахарного диабета 1 и 2 типа показано, что аминогуанидин предотвращает образование КПП. Период полураспада аминогуанидина в

плазме порядка 1 часа, поэтому его необходимо применять в относительно высокой дозе для получения терапевтической концентрации [Thornalley et al., 2003]. Однако высокие концентрации аминогуанидина нежелательны из-за его реакции с витамином В6.

Среди других веществ, действующих как ловушки КПП, следует отметить 2,3-диаминофеназин и пеницилламин [Song et al., 2021]. Однако на сегодняшний день отсутствуют исследования *in vivo*, идентифицирующие продукты реакций этих веществ с интермедиатами гликирования.

### ***Удаление свободных радикалов***

Окислительные процессы играют важную роль в развитии реакций неферментативного гликирования [Poulsen et al., 2013]. Поэтому снижение продукции АФК – это еще один способ борьбы с карбонильным стрессом. В литературе содержится большое количество информации, свидетельствующей о том, что многие соединения, нейтрализующие свободные радикалы, также предотвращают гликирование белков. Например, каратиноид астаксантин удаляет АФК и ингибирует неферментативное гликирование белков [Park et al., 2015]. Хлорогеновая кислота является перехватчиком свободных радикалов и одновременно регулирует экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [Kim et al., 2011]. Антигликирующие свойства проявляют соединения, останавливающие реакции ПОЛ за счет перехватывания радикалов. Среди природных соединений наиболее популярными перехватчиками радикалов являются витамины С и Е.

### ***Хелатирование ионов металлов***

Некоторые ионы металлов, такие как  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^+$  и  $Cu^{2+}$  участвуют в процессе неферментативного гликирования. В аэробных условиях эти металлы катализируют окисление сахаров, белков, нуклеиновых кислот и других биомолекул, тем самым способствуют образованию свободных радикалов и АКС. Например, восстанавливающие сахара, такие как глюкоза, при взаимодействии с ионами металлов образуют радикальные продукты. Липиды легко окисляются в присутствии ионов металлов с образованием

перекисных форм. Аминокислотные остатки белков образуют комплексы с ионами металлов и превращаются в карбонильные соединения в присутствии пероксида водорода [Trnkova et al., 2015]. Восстанавливающие сахара и липиды могут окисляться с образованием супероксида посредством реакций Фентона и Хабера-Вайса, что приводит к увеличению образования гидроксила, который стимулирует образование новых порций КПП [Nagai et al., 2012]. Поэтому один из способов борьбы с карбонильным стрессом заключается в применении хелаторов ионов металлов.

Во многих растениях содержатся вещества, обладающие значительной хелатирующей способностью. Как правило, это фенольные кислоты и флавоноиды, хелатирующее действие которых вызвано наличием катехиновой структуры [Andjelkovic et al., 2006]. Эти вещества ингибируют окисление восстанавливающих сахаров, липидов и белков и в значительной степени препятствуют образованию КПП [Sajithlal et al., 1999]. Тиамин и бенфотиамин также описаны как ингибиторы образования КПП [Balakumar et al., 2010].

Можно заключить, что дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на поиске таких веществ, которые одновременно являются ингибиторами КПП и эффективными хелаторами ионов металлов. Кроме этого, они должны перехватывать свободные радикалы, иметь достаточно длительный период полураспада *in vivo* и проявлять низкую токсичность. Многие типы природных соединений, такие как полифенолы, полисахариды, терпеноиды, витамины и алкалоиды, являются хорошими кандидатами для разработки новых лекарств, подавляющих образование КПП [Song et al., 2021].

#### **1.3.4. Роль карбонильного стресса в биологических системах**

##### ***Вредные эффекты***

КПП представляют собой группу молекул с разнообразными химическими свойствами. Биологические эффекты различных КПП очень похожи. КПП с высокой молекулярной массой обладают самым высоким патогенным потенциалом [Kirkwood, 2005]. Наиболее токсичны для организма



человека сшивающие КПП (kross-linking AGEs), поскольку они прочно связаны с белками и устойчивы к деградации [Jakus, Rietbrock, 2004].

Накопление КПП в нашем организме активирует различные сигнальных пути посредством взаимодействия с рецепторами на клеточной поверхности. Описаны два основных типа таких рецепторов: рецепторы-мусорщики (SR – Scavenger Receptor) и мультилигандный рецептор (RAGE – Receptor for Advanced Glycation Endproducts). Экспрессия рецепторов КПП зависит от типа клеток/тканей и регулируется в ответ на метаболические изменения, например, при старении, диабете и гиперлипидемии [Vlassara, 2001].

Например, связывание КПП с RAGE активирует внутриклеточный сигнальный каскад, что приводит к ингибированию индуцированной инсулином транслокации глюкозного транспортера GLUT-4 и как следствие к развитию резистентности к инсулину [Song et al., 2021]. RAGE запускает путь NADPH-оксидазы, что приводит к генерации АФК. Этот рецептор также активирует такие сигнальные пути как ERK/MAPK, JAK/STAT, также белок-1 (AP-1) и ядерный фактор NF-κB [Grillo et al., 2008]. Все эти транскрипционные факторы связаны со стрессом и воспалением. Эти сигнальные пути индуцируют экспрессию генов моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α, молекул адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), эндотелина-1 и др. Активация RAGE также изменяет состояние эндоплазматического ретикулума, что приводит к развитию воспаления или апоптоза. Кроме того, накопление КПП в эндоплазматическом ретикулуме нарушает нормальный фолдинг белка.

В настоящее время показано, что RAGE играет важную роль для нормальной физиологии. Чаще всего этот рецептор задействован в развитии иммунного ответа соответствующего органа: функционирование остеокластов в кости, активация микроглии в нервной системе, активация иммунных клеток. Поскольку функционирование RAGE зачастую носит негативный характер, этот рецептор рассматривают как фармакотерапевтическую мишень [Song et

al., 2021)]. Многие исследования на животных показали, что блокировка RAGE оказывает положительный эффект в клинических условиях.

Рецептор клеточной поверхности I для КПП принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) [Chavakis et al., 2003]. Он экспрессируется на поверхности нескольких типов клеток (моноциты/макрофаги, Т-лимфоциты, эндотелиальные клетки, дендритные клетки, фибробласты, гладкомышечные клетки, нейрональные клетки, глиальные клетки, хондроциты, кератиноциты) и распознает большое количество различных лигандов: КПП,  $\beta$ -амилоидный пептид, белок S100/кальгранулин, ядерный белок HMGB1 [Ott et al., 2014].

### *Полезные эффекты*

АКС, как и АФК, поначалу воспринимались исключительно как токсичные молекулы, роль которых в клетке сводится только к отрицательным эффектам. Дальнейшее изучение действия АКС на биологические системы выявило положительную функцию этих реакционноактивных соединений, которая во многом связана с активацией генов, кодирующих ферменты детоксикации активных форм кислорода, электрофильных соединений и ксенобиотиков [Космачевская с соавт., 2017]. Многие АКС (метилглиоксаль, глиоксаль, формальдегид и др.) проявляют свойства электрофилов и функционируют в качестве вторичных мессенджеров в передаче сигналов, т.е. участвуют в электрофильной сигнализации.

Представляется логичным приспособить спонтанно образующиеся соединения на благо клетки. Такая сигнальная система экономична с точки зрения затрат энергии на синтез белков [Космачевская, Топунов, 2021]. Сигнально-регуляторное действие метилглиоксаля в про- и эукариотических клетках было подробно рассмотрено в обзорах [Kosmachevskaya et al., 2015; Космачевская с соавт., 2017]. Информация о сигнальных свойствах липидных электрофилов представлена в обзорных статьях [Csala et al., 2015; Ayala et al., 2015].

При электрофильной сигнализации информация передается через реакционноактивные соединения, которые неферментативно модифицируют специфические белки-мишени [Космачевская с соавт., 2017]. Химическая и функциональная неразборчивость АКС делает их также потенциальным источником «шума» в процессах передачи сигнала в клетке [Космачевская, Топунов, 2021]. Биологические электрофилы сильно различаются по химическому строению и свойствам. Например, к ним относится формальдегид, 12-нитроарахидоновая кислота и стероидные  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные карбонилы [Schopfer et al., 2011].

Главными участниками электрофильной сигнализации, регулирующей защитные системы, являются белковые факторы Keap1/Nrf2, AhR, PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, SIRT-FOXO [Bhakta-Guha et al., 2015] и белки теплового шока [Dattilo et al., 2015]. Электрофильные соединения активируют также экспрессию генов белков множественной лекарственной устойчивости (MRP – Multidrug-Resistant Proteins). Для белков, активность которых модулируется электрофильными соединениями, даже был предложен специальный термин – электрофил-чувствительный протеом (electrophile-responsive proteome) [Higdon et al., 2012]. Также было показано, что электрофилы модулируют несколько ключевых сигнальных путей, регулирующих антиоксидантный ответ, апоптоз, реакцию на повреждение ДНК и рост клеток [Космачевская с соавт., 2019].

Одним из механизмов действия АКС на сигнальные внутриклеточные пути является обратимая модификация белковых SH-групп [Liu et al., 2005; Космачевская с соавт., 2019]. Разнонаправленное действие АКС можно объяснить их способностью в низких концентрациях избирательно модифицировать SH-группы транскрипционного фактора Keap1, посредством алкилирования или окисления. Эта модификация приводит к повышению устойчивости клеток к окислительному стрессу. В умеренно высоких концентрациях электрофилы активируют факторы транскрипции (Nrf2, AP-1, NF $\kappa$ B, PPARs) и MAP-киназы (JNK и p38) [Sawa et al., 2007; Taguchi et al.,

2017]. При прогрессирующем увеличении концентрации электрофилов снижается селективность их действия [Космачевская с соавт., 2019]. В высоких концентрациях электрофилы, в том числе некоторые АКС, активно модифицируют SH-группы нецелевых белков. Это приводит к нарушению функционирования белков, помехам в передаче сигналов, и развитию цитотоксических эффектов [Омельчук с соавт., 2015]. Например, MG в низких концентрациях (0-150 мкМ) повышает жизнеспособность и возбудимость сенсорных нейронов мыши, а в высоких концентрациях (250-750 мкМ) оказывает цитотоксическое действие [Radu et al., 2012]. Было показано, что низкие дозы MG провоцируют рост опухоли *in vivo*, а высокие дозы, наоборот, ингибируют рост [Nokin et al., 2017]. Дозозависимый эффект MG был показан в экспериментах на нескольких линиях раковых клеток. При экзогенном добавлении MG клетки демонстрировали повышенное количество внутриклеточного MG и индуцировали *de novo* синтез GLO-I и экспрессию Nrf2. Таким образом, формировалась адаптация гликолитических раковых клеток к карбонильному стрессу.

АКС, как и АФК, могут выступать в роли факторов стресс-индуцируемого мутагенеза прокариот [Космачевская с соавт., 2015]. АКС, образуемые самими клетками, проявляя мутагенный эффект, выступают активными пособниками эволюции [Космачевская с соавт., 2015, 2019]. В случае раковых клеток это может приводить к образованию линий клеток с высокой выживаемостью. Также АКС могут выступать как факторы борьбы с чужеродными организмами.

### **1.3.5. Взаимосвязь КППГ с окислительным и нитрозативным стрессами**

В ряде исследований показано, что карбонильный стресс тесно связан с окислительным [Baynes, 1991; Rosca et al., 2005; Шумаев с соавт., 2009; Скулачев с соавт., 2014; Космачевская с соавт., 2017, 2019].

Как было описано выше, образование КППГ зависит от концентрации АКС и АФК. Активные формы азота являются продуктами реакции NO и  $O_2^{\bullet-}$

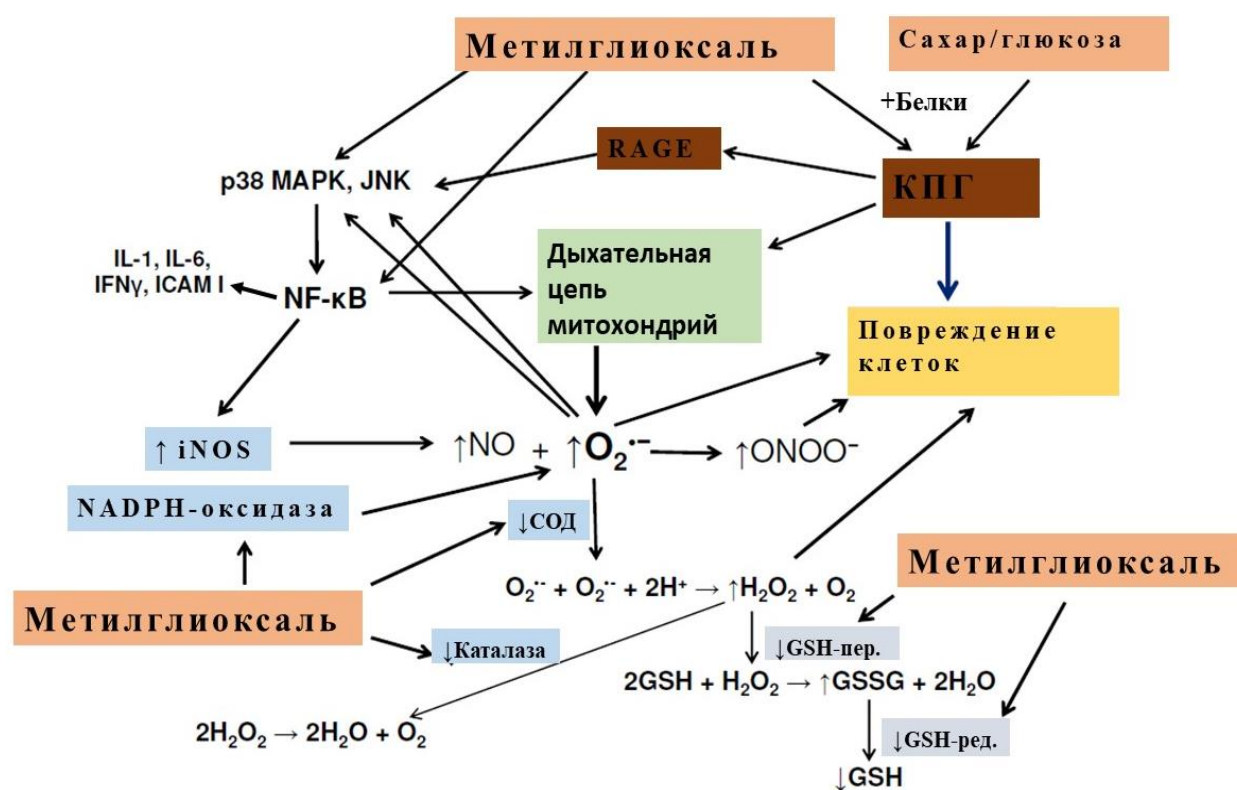
[Zhang et al., 2006]. NO, как правило, образуется при индукции iNOS цитокинами, а  $O_2^{\bullet-}$  при активации NADPH-оксидазы посредством взаимодействия КПП с RAGE. Кроме того, увеличение количества АФК активирует транскрипционный фактор Nf- $\kappa$ B, что приводит к активации iNOS и дополнительному усилению нитрозативного стресса и образованию повышенных уровней пероксинитрита (рисунок 1.3.2.) [Wong et al., 2001]. Так, была показана взаимосвязь между активацией RAGE посредством КПП и увеличением нитрованного тиоредоксина у мышей после диабетического ишемически-реперфузионного повреждения миокарда. Повышенные уровни RAGE привели к инактивации тиоредоксина за счет усиления нитрования, в следствие чего была нарушена его антиоксидантная функция и функция защиты сердца.

Оксид азота и его производные влияют как на ферментативные, так и неферментативные процессы, происходящие при карбонильном стрессе. Например, активность основного антигликирующего фермента GLO-I снижается при взаимодействии с S-нитрозоглутатионом и другими донорами NO [Mitsumoto et al., 2000]. Помимо этого, S-нитрозоглутатион способствует развитию карбонильного стресса за счет стимуляции в клетках синтеза альдолазы, гликолитического фермента [Yan et al., 2017]. Также S-нитрозоглутатион вызывает увеличение количества анион-радикалов MG (семиидона), образующихся в реакции между MG и лизином, хотя другие доноры NO и  $NO^-$  (PAPANONOate и соль Ангели) такого эффекта не дают [Shumaev et al., 2022]. При этом высокие концентрации S-нитрозоглутатиона, способны снижать выход органических радикалов в реакции Майара. При наличии кислорода в среде анион радикал MG может восстанавливать кислород до супероксид-аниона [Шумаев с соавт., 2009]. Образующий в аэробной среде  $O_2^{\bullet-}$  инициирует цепные реакции ПОЛ, в результате которых образуются новые АКС [Yim et al., 1995; Lee et al., 1998; Шумаев с соавт., 2009]. Таким образом, карбонильный стресс способствует развитию

окислительного стресса и, наоборот, окислительный стресс усиливает карбонильный.

Шумаевым К.Б. с коллегами были получены ДНКЖ, лигандами которых являются продукты взаимодействия MG и лизина [Shumaev et al., 2023]. Вероятно, что и другие интермедиаты реакций, протекающих при карбонильном стрессе, могут выступать в роли лигандов ДНКЖ. Распад этих комплексов проходит достаточно активно в присутствии кислорода или  $O_2^{\bullet-}$ . В условиях гипоксии эти комплексы более стабильны. Эти процессы могут объясняться появлением ONOON в качестве лиганда ДНКЖ в присутствии кислорода [Tran et al., 2011].

Nagai с соавторами показали, что АФА участвуют в генерации КПГ. Например, инкубация гликированного сывороточного альбумина человека с пероксинитритом приводит к увеличению образования карбоксиметиллизина [Nagai et al., 2007].



**Рисунок 1.3.2.** Активация путей развития окислительного стресса при действии метилглиоксаля и конечных продуктов гликирования. Модифицировано по [Dhar et al., 2012].

Реакции карбонильного и окислительного стресса тесно связаны. Во многом эта связь обусловлена тем, что ПНЖК, входящие в состав всех мембран клеток млекопитающих и растений, чрезвычайно чувствительны к окислению. В результате реакций перекисного окисления образуются радикалы липидов, которые реагируют с сахарами с образованием АКС. Например, такие важные побочные продукты ПОЛ, как малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль, давно связывают с метаболическими нарушениями у пациентов с диабетом 2 типа. У таких пациентов повышенный уровень липидов в кровотоке, включая липопротеиды низкой плотности и триглицериды, которые являются мишенью действия АФК, что запускает реакции ПОЛ. Этот процесс в значительной степени истощает пул внутриклеточных антиоксидантов, вызывая окислительный стресс, что способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний [Lankin et al., 2007; Shabalala et al., 2022].

Метилглиоксаль способствует продукции супероксида, перекиси водорода и пероксинитрита, а также провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8) и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) в различных типах клеток [Di Loreto et al., 2004]. Было показано, что MG повышает активность некоторых прооксидантных ферментов и белков, таких как NADPH-оксидаза, p38, MAPK, а также увеличивает экспрессию JNK [Amicarelli et al., 2003]. В тоже время инактивация антиоксидантных ферментов гликированием еще в большей степени усиливает окислительное повреждение, вызванное окислительным стрессом. Например, воздействие глюкозы на супероксиддисмутазу (СОД) приводит к ее фрагментации, ковалентному сшиванию и потере ферментативной активности.

В экспериментальных системах *in vitro* было показано, что различные АКС – 4-гидроксиноненаль, 3-дезоксиглюкозон, глиоксаль, метилглиоксаль и малоновый диальдегид ингибируют Cu,Zn-СОД и глутатионпероксидазу

[Song et al., 2021]. Показано, что в условиях гипергликемии существенно снижается активность эритроцитарной СОД [Lankin et al., 2016].

Метилглиоксаль увеличивает продукцию супероксида в митохондриях [Rabbani et al., 2008]. Обработка клеток аорты крысы MG значительно увеличивала продукцию митохондриального супероксида по сравнению с необработанными клетками. Разрушители перекрестных связей в КПП – алагебриум и миметик СОД значительно снижали продукцию митохондриального супероксида, индуцированную MG [Wang et al., 2009].

В заключении отметим, что взаимосвязь между образованием КПП, окислительным и нитрозативным стрессом, главным образом, обусловлена количеством активных форм кислорода и азота, а также антиоксидантным статусом клеток (рисунок 1.3.2.). Дисбаланс между антиоксидантной активностью и продукцией КПП, опосредованной АФК, способствует прогрессированному накоплению АФК и АФА в клетках и тканях.

### **1.3.6. Карбонильный стресс в бактериях**

Карбонильному стрессу также подвержены и бактериальные клетки. Карбонильный стресс в прокариотах протекает отлично от эукариотических организмов. Подробно особенности карбонильного стресса у бактерий описаны в обзорной статье [Космачевская с соавт., 2015]. Впервые неферментативное гликирование в *Escherichia coli* показали болгарские исследователи [Mironova et al., 2001, 2003]. Затем Пеппер обнаружил увеличение количества гликированных белков в клетках в стационарной фазе роста и при добавлении глюкозы к среде Luria–Bertani [Pepper, 2007]. Авторам работы [Космачевская, Топунов, 2010] также удалось выделить неферментативно гликированный леглобин (гемоглобин бобовых растений) из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном этого белка.

Отметим два основных фактора, способствующих развитию карбонильного стресса в прокариотических клетках. Это интенсивный метаболизм углеводных субстратов и избыточное образование АФК. Этому



благоприятствуют условия резкого перехода на субстраты с высокой концентрацией углеводов или стационарная фаза [Космачевская с соавт., 2015]. В стационарной фазе роста бактерий часто продуцируются большие количества АФК. Кроме того, в стационаре бактериальные клетки испытывают дефицит питательных веществ и переходят в состояние с пониженной метаболической активностью, образуя так называемые переживающие формы – некультивируемые, но жизнеспособные (VBNC – Viable But Non-Culturable) [Desnues et al., 2003]. Неспособность таких бактерий к делению в сочетании с замедленным метаболизмом и окислительным стрессом способствуют накоплению гликированных аддуктов внутри клеток [Pepper, 2007].

В отличие от эукариот, бактерии наделены ферментативной системой синтеза МГ – метилглиоксальсинтазой (MgsA) (EC 4.2.3.3.), которая катализирует гидролиз дигидроксиацетонфосфата (DHAP) до МГ и неорганического фосфата (Pi) [Cooper, Anderson, 1970] (рисунок 1.3.3.).

Показано, что в некультивируемых клетках *E. coli* повреждена ферментативная антиоксидантная система. Поэтому такие клетки характеризуются высоким уровнем окислительно модифицированных белков и других биомолекул [Dukan, Nyström, 1998], низким уровнем экспрессии универсального стрессового белка А (UspA) [Nyström, Neidhardt, 1994] и повышенным уровнем экспрессии стрессовых регулонов: RpoS, SoxRS, RpoH, RpoE, CpxR [Desnues et al., 2003]. Это объясняет наблюдаемое 3-4 кратное повышение уровня неферментативно гликированных белков и нуклеиновых кислот в метаболически инертной переживающей культуре *E. coli* по сравнению с клетками экспоненциальной фазы [Космачевская, Топунов, 2010; Pepper, 2007].

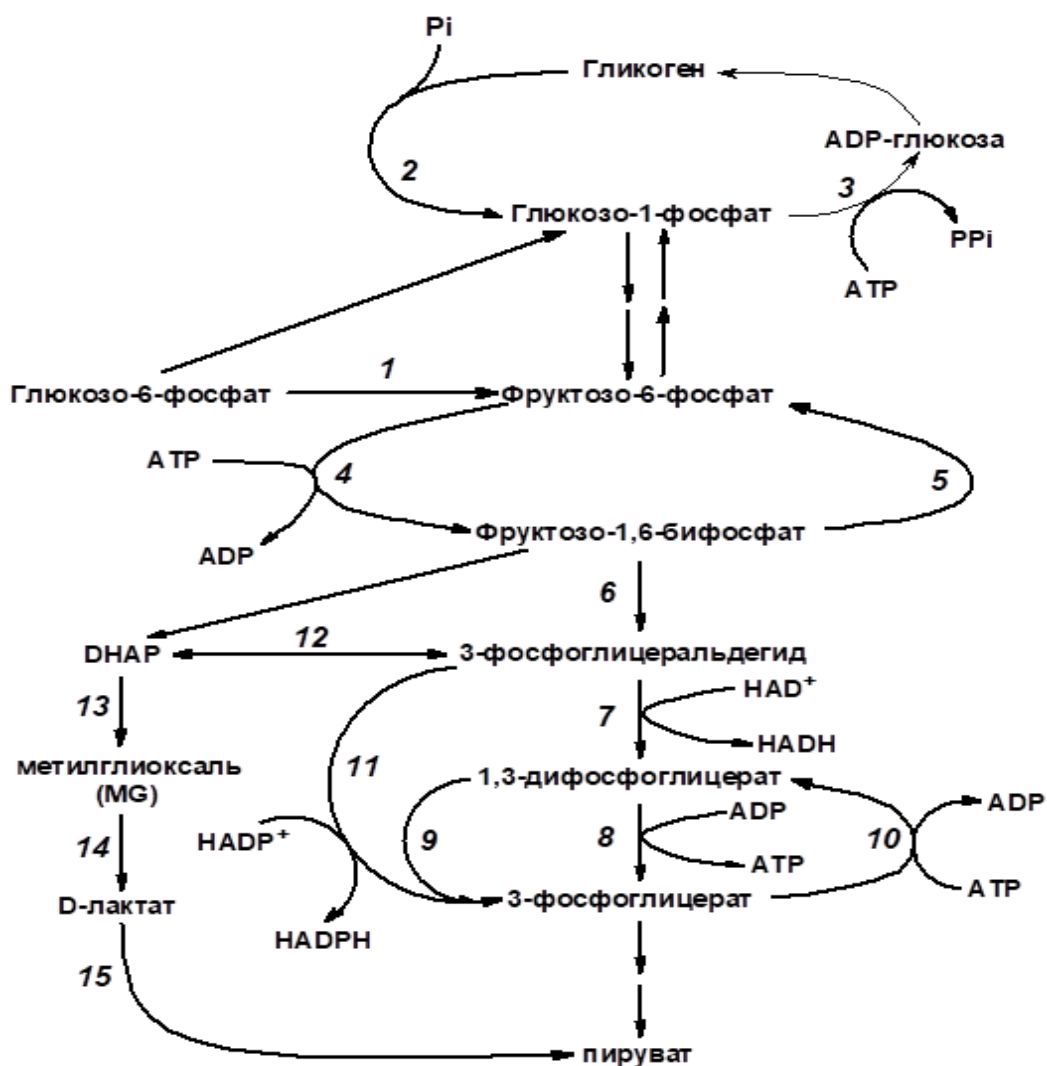
Недостаток или инактивация фермента GloI, который основную роль в детоксикации МГ, также может служить причиной карбонильного стресса. Было показано, что дефицит GloI повышает чувствительность клеток *E. coli*, выращенных в анаэробных условиях, к действию МГ [Zhu et al., 2001]. О

важности GloI для нормального роста клеток свидетельствуют также данные о снижении выживаемости *Streptococcus mutans* и *Salmonella typhimurium*, дефицитных по *gloA*, при культивировании на средах с высоким содержанием сахара [Korithoski et al., 2007; Chakraborty et al., 2015]. Напротив, дополнительная экспрессия GloI из *Pseudomonas putida* делает клетки кишечной палочки более стрессоустойчивыми [Zhu et al., 2001].

Карбонильный стресс тесно связан с высокими концентрациями глюкозы в среде обитания бактерий. Сама по себе глюкоза не является токсичным веществом и для многих микроорганизмов является наиболее предпочтительным источником углерода. Бактерии имеют сложную систему регуляции поступления этого субстрата внутрь клетки, согласованную с доступностью источников азота и фосфора. Поэтому при нормальном функционировании регуляторных систем и систем детоксикации MG, карбонильный стресс маловероятное событие в жизни бактериальной клетки.

С высокими концентрациями сахаров бактерии, как правило, сталкиваются в условиях лабораторного культивирования. В природе существует сильная конкуренция за ограниченные питательные ресурсы, и большинство бактерий живут в условиях голода. Поэтому разобщение анаболических и катаболических процессов происходит только при резком переходе от условий голода к изобилию, но не наоборот [Weber et al., 2005], хотя и в первом, и во втором случаях происходит мгновенное увеличение цАМФ [Weber et al., 2005], что может привести к неконтролируемому транспорту глюкозы и других углеродсодержащих субстратов внутрь клетки.

Понимание биохимических механизмов карбонильного стресса в бактериях важно не только с точки зрения «нового» знания, интересного для эволюционной биологии, но и может быть полезно для выработки мер профилактики гастроэнтерологических расстройств, создания пробиотиков, а также в реализации различных практических задач, связанных с метаболической инженерией.



**Рисунок 1.3.3. Футильные циклы и шунты гликолитического пути в бактериях.** Цифры рядом со стрелками обозначают ферменты, катализирующие соответствующие реакции. 1 – глюкозофосфатизомераза, 2 – гликогенфосфорилаза, 3 – ADP-глюкозопирофосфорилаза, 4 – фосфофруктокиназа, 5 – фруктозодифосфатаза, 6 – фруктозодифосфатальдолаза, 7 – глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPD), 8 – фосфоглицераткиназа, 9 – окисленная GAPD, 10 – Фосфоглицераткиназа, 11 – нефосфорилирующая глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPN), 12 – триозофосфатизомераза, 13 – метилглиоксальсинтаза, 14 – Глиоксалаза I/II, 15 – D-лактатдегидрогеназа.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Используемые реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: метилглиоксаль, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), буфер HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid), диметилсульфоксид (DMSO, Dimethyl sulfoxide), *N*-этилмалеимид (NEM, *N*-ethylmaleimid), гидропероксид *трет*-бутила, 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), полиакриламид (ПАА, polyacrylamide), додецилсульфат натрия (SDS, sodium dodecyl sulfate,), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), *N,N,N',N'*-tetramethylbenzene-1,4-diamine (TMPD), 2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (AAPN), *N*-ацетилцистеин, липоевая кислота, 3-морфолиносиднонимин (SIN-1), дигидрородамин 123 (DHR123), 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Трис), дитиотреитол (ДТТ), дифенилтетразолий бромид (МТТ), бромфеноловый синий, глицин, глицерин, *L*- $\alpha$ -фосфатидилхолин, антимицин А, ферритин, коэнзим Q<sub>1</sub>,  $\alpha$ -tocopherol, 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN), 4,5-диоксибензол-1,3-дисульфат натрия (TIRON), 5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-талазиндион (люминол) — «Sigma-Aldrich» (США); метгемоглобин из эритроцитов быка, каталаза из печени быка, трихлоруксусная кислота (ТХУ), пиридин, дитионит натрия, азид натрия — «Sigma-Aldrich» (США); среда LB — «AppliChem» (Германия); триоксодинитрат натрия (соль Ангели, Angeli's salt), *N*-гидроксибензолсульфонамид (кислота Пилоти, Piloty's acid), Propylamine Propylamine NONOate — «Cayman Chemical Europa» (Эстония); 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-*N*-оксид (DEPMPO), 4-гидрокси(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (4-гидрокси-TEMPO) — «Oxis» (США); 3Н-нафтол[2,1-*b*]пиран-*s*-карбоновая кислота (ThioGlo1) — «Calbiochem» (США); *L*-глутатион, бычий сывороточный альбумин (БСА) — «AppliChem» (Германия); изопропанол, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MnO<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub> — «Химмед» (Россия).

## 2.2. Синтез нитрозотиолов, динитрозильных комплексов железа и пероксинитрита

*S*-нитрозоглутатион (GSNO) и *S*-нитрозоцистеин (CysNO) синтезировали, смешивая в кислой среде эквимольные концентрации  $\text{NaNO}_2$  и восстановленного глутатиона или цистеина, соответственно. Концентрацию нитрозотиолов определяли спектрофотометрически по поглощению при  $\lambda=335$  нм ( $\varepsilon = 774 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ ) синтезировали, как описано в работе [Shumaev et al., 2008], пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор  $\text{FeSO}_4$  (5 мМ) в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,0).

ДНКЖ с *N*-ацетилцистеином (AcCys-ДНКЖ) и глутатионом (GS-ДНКЖ) синтезировали, добавляя к *S*-нитрозотиолу  $\text{FeSO}_4$  до конечной концентрации ~ 10,8 мМ, и далее доводили pH смеси до 7,0 с помощью HEPES.

Концентрация ДНКЖ по данным ЭПР была ~ 4,0 мМ. Соотношение Fe : тиол в AcCys-ДНКЖ составляло 1 : 25, в GS-ДНКЖ – 1 : 10.

Синтез ДНКЖ с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) проводили, добавляя ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  к раствору липоевой кислоты в изопропанол. Конечная концентрация LA-ДНКЖ составляла 1,5 мМ.

Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота или при  $-70$  °С.

Пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) синтезировали по методике, описанной в работе [Karoui et al., 1996], быстро смешивая охлажденные на льду растворы 1 М  $\text{NaNO}_2$  и 1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 0,3 М серной кислоте, после чего добавляли равный объём 1,4 М NaOH. Избыток  $\text{H}_2\text{O}_2$  удаляли, добавляя порошкообразный  $\text{MnO}_2$  (~1 мг/мл), который затем отделяли фильтрованием. Концентрацию

пероксинитрита определяли по характерной полосе поглощения при  $\lambda=302$  нм ( $\varepsilon = 1,67 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ).

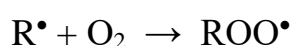
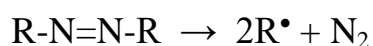
Связанные с белками ДНКЖ получали добавлением ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  к 0,15 мМ раствору БСА в молярном соотношении 1 : 1,5 и к 0,15 мМ раствору Нв в молярном соотношении 1 : 3.

### **2.3. Получение токофероксильного радикала (раздел 3.2.2.)**

Раствор 0,1 М токоферола ( $\alpha$ -ТОН) в изопропанолe окисляли  $\text{MnO}_2$  до токофероксильного радикала. Для отчистки раствора от оксида марганца раствор пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрация токофероксильного радикала была  $\sim 70$  мМ.

### **2.4. Продукция свободных радикалов с участием азоинициаторов (раздел 3.1.1.)**

Перекисное окисление в липосомах и мицеллах из жирных кислот индуцировали гидрофобным азоинициатором – 2,2'-азобис(2-метилпропионитрилом) (AIBN). В ходе термоиндуцированной декомпозиции при аэробной инкубации азоинициатора продуцируются алкильные и пероксильные радикалы в следующих реакциях [Laguette, 2007]:



### **2.5. Получение липосом и мицелл из жирных кислот (раздел 3.1.1.)**

Липосомы из жирных кислот получали, добавляя к 250 мкл раствора яичного фосфатидилхолина в хлороформе (100 мг/мл) 3 мг AIBN. После испарения хлороформа в потоке газообразного азота, полученные сухие липидные пленки гидратировали в Na,K-фосфатном буфере (100 мМ, pH 7,4) при комнатной температуре и встряхивали на вортексе в течение 5 минут. Полученную дисперсию пропускали 15 раз через установку для получения липосом, оснащенную мембраной с размером пор 0,22 микрометра. В течение

эксперимента полученная суспензия липосом находилась в холодильнике при 4°C.

Мицеллы из жирных кислот получали впрыскиванием этанольного раствора полиненасыщенных жирных кислот в фосфатный буфер и последующим интенсивным встряхиванием на вортексе. Объемное содержание этанола в суспензии мицелл и липосом не превышало 4%.

## **2.6. Перекисное окисление липидов, индуцированное медью (раздел 3.1.1.)**

### ***Выделение липопротеидов низкой плотности***

Выделение липопротеидов низкой плотности (ЛНП) осуществляли на базе ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России НИИ экспериментальной кардиологии. Образцы венозной крови здоровых доноров брали натощак (до еды) и использовали плазму для выделения ЛНП. К образцам добавляли 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Плазму дважды центрифугировали в градиенте плотности NaBr при 4 °С, 41000 об/мин в течение 2 часов на ультрацентрифуге Beckman L-8 (США), а затем диализовали при 4 °С в 50 мМ Na,K-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 16 часов. Содержание белка в ЛНП определяли по методу Лоури.

### ***Перекисное окисление ЛНП***

ЛНП разбавляли до 50 мкг/мл в 50 мМ K, Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,154 мМ NaCl, а затем добавляли различное количество глюкозы (от 12,5 до 100 мМ). Окисление ЛНП при 37 °С инициировали добавлением 30 мкМ CuSO<sub>4</sub> и измеряли накопление липогидропероксидов (диеновых конъюгатов) через фиксированные промежутки времени при 234 нм. Полученные результаты использовали для построения кинетических кривых окисления ЛНП. В некоторых экспериментах в среду инкубации также добавляли фосфатные или глутатионовые ДНКЖ в концентрации 20 мкМ, GSH в концентрации 40 мкМ.

## **2.7. Модельная система соокисления липидов и глюкозы (раздел 3.1.1.)**

Липосомы из яичного *L*- $\alpha$ -фосфатидилхолина, содержащие гидрофобный азоинициатор AIBN, получали, как описано в разделе 2.5. Реакционная среда содержала 100 мМ фосфатный буфер (рН 7,6), 25 мМ глюкозы, 1,4 мМ фосфатидилхолина, 1,4 мМ, азоинициатора и 17, 34 и 50 мкМ глутатионовых ДНКЖ.

## **2.8. Получение изолированных митохондрий (раздел 3.2.1.)**

Митохондрии выделяли из сердца крыс линии Wistar. После усыпления крысы внутрибрюшинным введением уретана (1,8 мг/кг массы животного) или авертина (250 мг/кг массы животного) сердце извлекали и помещали в охлаждённую (4 °С) среду выделения, которая содержала: 70 мМ сахарозы, 220 мМ маннитола, 50 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА (рН 7,4). Далее сердце перекладывали в охлаждённую (4 °С) чашку Петри, освобождали от предсердий и надрезали четыре раза с боков для лучшей отмывки от крови. После этого сердце измельчали ножницами, снова промывали раствором среды выделения и пропускали через сито из нержавеющей стали (диаметр отверстий 0,8 мм) и гомогенизировали в течение 2-3 мин при соотношении ткань сердца/среда выделения 1 : 8. Осаждение митохондрий производили в два этапа на центрифуге MLW К-24 (ГДР). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 700 g, супернатант, в котором содержались митохондрии, фильтровали и снова центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. Осадок митохондрий, суспендировали в среде выделения, содержащей 3 мг/мл БСА, и в течение эксперимента хранили во льду. Выделение митохондрий проходило на базе ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России НИИ экспериментальной кардиологии.

Эксперименты на здоровых крысах-самцах линии Вистар проводили в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» и с предварительного одобрения Комитета по этике



животных Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» (Россия).

## **2.9. Регистрация спектров ЭПР (раздел 3.1.1.)**

### ***ЭПР спектроскопия***

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E "Varian" (США) при комнатной температуре ( $\sim 25$  °С) и на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 «КБСТ» БГУ (Беларусь). Спектры, полученные на E-109E, записывались и обрабатывались с помощью специальной программы, созданной на кафедре биофизики физического факультета МГУ Б.В. Трубициным [Трубицин с соавт, 1998].

Для поддержания постоянного газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемый PTFE Sub-Lite-Wall капилляр (внутренний диаметр 0,635 мм, толщина стенки 0,051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Этот капилляр складывался вдвое и вводился в кварцевую трубку (диаметром  $\sim 4$  мм), открытую с обоих концов. Во время регистрации спектра через кварцевую трубку, помещенную в резонатор ЭПР-спектрометра, продували газовый поток варьируемого состава.

***Образование супероксидных радикалов изолированными митохондриями*** регистрировали с помощью ЭПР-детектируемой ловушки супероксида TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфат натрия). Скорость образования супероксидных радикалов в реакционной смеси пропорциональна квадрату интенсивности сигнала ЭПР свободных радикалов (семихинона) TIRON [Ledenev et al., 1986; Korkina, Ruuge, 2000]. Среда инкубации митохондрий содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 10 мМ TIRON (pH 7,4). Концентрация митохондрий в среде инкубации составляла 1-2 мг/мл. Условия регистрации спектров ЭПР семихинона TIRON на спектрометре E-109E "Varian"(США): СВЧ мощность 5 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,05

мТл; на спектрометре ESR 70-03 XD/2: ослабление СВЧ мощности 10 дБ, СВ частота 9,32 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,05 мТл.

**Образование алкилпероксильных, алкоксильных и тиольных радикалов** регистрировали с использованием спиновой ловушки DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-*N*-оксид) [Шумаев с соавт., 2004; Karoui et al., 2011]. Условия регистрации спектров ЭПР аддуктов DEPMPO с различными свободными радикалами на спектрометре E-109E: СВЧ мощность 10 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,1 мТл. Условия записи спектров ЭПР парамагнитных ДНКЖ аналогичны, но амплитуда ВЧ модуляции менялась в диапазоне 0,1-0,4 мТл.

## **2.10. Использование метода хемилюминесценции для определения активных форм кислорода и азота в модельных системах (раздел 3.1.1.)**

Метод хемилюминесценции выгодно отличается от метода ЭПР или флуориметрии, поскольку практически не нарушает ход реакций, а также способен регистрировать даже чрезвычайно реакционноспособные радикалы, не смотря на их низкую концентрацию в среде. Поскольку собственная хемилюминесценция радикалов имеет очень слабую интенсивность был использован такой химический активатор как люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-талазиндион, гидразид 3-аминофталевой кислоты). Для регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции использовали люминометр Lum-5773 (Россия).

В эксперименте с мицеллами из линоленовой кислоты реакционная смесь содержала: 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (pH ~ 7,6), 2 мМ линоленовой кислоты, 1 мМ азоинициатора AIBN и 2 мМ люминола, общий объем реакционной смеси ~ 1 мл. К этой смеси добавляли глутатионовые ДНКЖ в разных концентрациях.

В эксперименте с липосомами концентрация ДНКЖ составляла 70 мкМ, донора оксида азота PAPA/NONO 0,2 мМ, фосфатидилхолина и азоинициатора 1,4 мМ, глюкозы 25 мМ.

Инкубация в ходе измерения проводилась при температуре 50 °С и при постоянном перемешивании реакционной среды. Кинетику люминол-зависимой хемиллюминесценции регистрировали через 2-3 секунды после смешения компонентов.

## **2.11. Получение модифицированного метилглиоксалем гемоглобина.**

### **Влияние соли Ангели и аминогуанидина (раздел 3.3.1.)**

Получение неферментативно гликированного гемоглобина осуществляли в системе *in vitro* при инкубации с метилглиоксалем в присутствии или в отсутствии донора нитроксила в течение 1-4 суток при 37 °С. Отбор проб белка для анализа КППГ производили через каждые сутки. Непрореагировавший МГ удаляли диализом в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение ночи при 4 °С. К раствору 0,15 мМ metHb (metHb<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O или metHb<sup>3+</sup>-N<sub>3</sub>) в 50 мМ К-фосфатном буфере добавляли 40 % раствор МГ до конечной концентрации 54 мМ (молярное соотношение в пересчете на субъединицы Hb 1 : 90) и инкубировали в течение 4 суток при 37 °С. Донор нитроксила Соль Ангели в 10 мМ NaOH вносили до конечной концентрации 3,5 мМ. Для получения Hb<sup>3+</sup>-N<sub>3</sub> и NEM-Hb<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O к 0,15 мМ раствору metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли NaN<sub>3</sub> до конечной концентрации 55 мМ или NEM до конечной концентрации 0,4 мМ.

В экспериментах по изучению антигликирующего действия различных концентраций соли Ангели, ионов нитрита и аминогуанидина к раствору 0,15 мМ metHb (Hb<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O / Hb<sup>3+</sup>-N<sub>3</sub> / NEM-Hb<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O) в 50 мМ К-фосфатном буфере добавляли 40 % раствор МГ до конечной концентрации 54 мМ (молярное соотношение в пересчете на субъединицы Hb 1 : 90) и инкубировали в течение 20 минут. Затем добавляли соль Ангели, нитрит натрия или аминогуанидин до конечных концентраций 2, 4, 6, 8 мМ и инкубировали в течение суток при 37 °С. Образцы гликированного Hb диализовали в 20 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение ночи при 4 °С.

## 2.12. Измерение конечных продуктов гликирования (раздел 3.3.1.)

Некоторые конечные продукты неферментативного гликирования (пентозидин, аргпиримидин, пирропиридин, пентодилизин, весперлизин А, В и С) обладают автофлуоресценцией. Благодаря этому их свойству можно регистрировать образование КППГ на белках по увеличению флуоресценции при определенных длинах волн ( $\lambda_{\text{возб}}=334$  нм,  $\lambda_{\text{исп}}=440$  нм) [Sell et al., 1991; Song et al., 2021].

Анализ степени гликирования гемоглобина производили по автофлуоресценции связанных с белком КППГ. Перед измерением образцы белка разбавляли в 80 раз 20 мМ К-фосфатным буфером (рН 7,4). Флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301-РС (Япония) в микрокювете 0,5 мл при средней скорости сканирования, высокой чувствительности и ширине щели возбуждающего и испускающегося света 5 нм и 10 нм соответственно.

## 2.13. SDS-электрофорез в ПААГ (разделы 3.1.2. и 3.3.1.)

Электрофорез проводили в блоках 12% ПААГ размером 150×150×1 мм по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. К растворам белка добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1, прогревали в течение 5 мин при 95 °С и наносили на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0,1 М Трис-НСI буфера (рН 6,8) с 4% SDS, 0,2% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили по 10 мкл раствора белка. В качестве электродного буфера использовали 0,2 М Трис-глициновый буфер (рН 8,3), содержащий 0,1% SDS. Электрофорез проводили при 4 °С и I=50 мА, U=150 В течение 160 минут. Необходимые параметры электрофореза обеспечивались источником питания «Эльф-4» (Россия).

### 2.14. Гель-проникающая хроматография (раздел 3.3.1.)

Образцы гемоглобина (приготовленные как описано в п. 2.11) подвергали гель-фильтрации на колонке (43 × 2,2 см) с носителем Toypearl HW-55F, уравновешенной 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5) с 0,2 М NaCl. Скорость потока колонки 20 мл/час на выходе поддерживалась с помощью перистальтического насоса (Microperpex peristaltic pump2132) «LKB» (Швеция). Объем наносимого на колонку раствора Hb составлял 1,5 мл. Выход фракций с колонки регистрировали по изменению оптической плотности при 280 нм.

### 2.15. Окислительная модификация гемоглобина гидропероксидом *трет*-бутила (раздел 3.3.1.)

Для изучения влияния донора нитроксила – соли Ангели на окислительную модификацию гемоглобина в качестве окислителя использовали гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH), который добавляли к 0,15 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,4) до различных конечных концентраций: 0,4; 0,6, 1; 1,6; 2,6; 4,2 мМ. Раствор соли Ангели в 10 мМ NaOH вносили до конечной концентрации 2 мМ. По истечении 15 минут образцы гемоглобина анализировали на содержание карбонильных производных и интактных гемовых групп.

### 2.16. Определение белковых карбониллов (раздел 3.3.1.)

Количественную оценку карбонильных производных гемоглобина производили по методу [Schmorak, Lewin, 1961] в модификации М.А. Фоминой и Ю.В. Абаленихиной [Абаленихина, Фомина, 2014]. Суть метода заключается в образовании ковалентных аддуктов карбонильных групп (альдо- и кето- групп) с 2,4- динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), которые регистрировали спектрофотометрически при 13 длинах волн. Количество образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов рассчитывали по формуле:

$$S_{\text{ОМБ}} = S_{\text{АДНФГ}} + S_{\text{КДНФГ}}$$

$$S_{\text{АДНФГ}} = (A_{230}+A_{254})\times 12 + (A_{254}+A_{270})\times 8 + (A_{270}+A_{280})\times 5 + (A_{280}+A_{356})\times 38 + (A_{356}+A_{363})\times 3,5 + (A_{428}+A_{520})\times 46$$

$$S_{\text{КДНФГ}} = (A_{363}+A_{370})\times 3,5 + (A_{370}+A_{428})\times 29 + (A_{430}+A_{434})\times 2 + (A_{520}+A_{535})\times 7,5$$

К 0,1 мл раствора белка добавляли 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ в 2 М НСІ и инкубировали в течение часа. Белок осаждали добавлением 0,5 мл 20% раствора ТХУ. По прошествии 10 минут образцы центрифугировали (3000 g, 15 мин). Для удаления несвязавшегося 2,4-ДНФГ белковый осадок трижды отмывали смесью этилового спирта и этилацетата (1 : 1) (0,4 мл). Полученный осадок подсушивали на воздухе и перед измерением растворяли в 1 мл 8 М раствора мочевины.

### 2.17. Содержания гемовой группы (раздел 3.3.1.)

Концентрацию гема в растворе гемоглобина регистрировали с помощью пиридинохромового метода [Riggs, 1981]. К 15 мкл раствора гемоглобина добавляли 135 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. Непосредственно перед измерением раствор восстанавливали дитионитом натрия. Оптическое поглощение восстановленного комплекса гема с пиридином измеряли при 556 и 539 нм. Расчет концентрации гема осуществляли по разнице  $A_{556}-A_{539}$ , учитывая, что,  $\epsilon_{556-539} = 4,3 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

### 2.18. Оценка антиоксидантных/антирадикальных свойств нитроксила (раздел 3.3.1.)

#### *Люминол-зависимая хемилюминесценция*

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем и гидропероксидом *трет*-бутила оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол.

Для исследования образования свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем состав реакционной среды был следующий: 0,15 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,4), 54 мМ MG (молярное соотношение в пересчете на субъединицы Hb 1 : 90), 8 мМ соли Ангели. Смесью инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, перед измерением

добавляли люминол до конечной концентрации 2 мМ. Для исследования образования свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с *t*-ВООН состав реакционной среды был следующий: 0,15 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), 0,6 мМ *t*-ВООН, 2 мМ люминола.

Регистрацию хемилюминесценции осуществляли в течение 6 минут на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия). Регистрацию начинали через 2-3 секунды после смешения компонентов реакционной смеси.

### ***Получение и регистрация оксоферрилHb***

ОксоферрилHb (Hb-Fe<sup>4+</sup>=O) был получен добавлением к 0,03 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) 0,4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в соотношении 3 : 1 в расчете на субъединицы белка. После 3 минут инкубации добавляли каталазу (0,456 единиц) для удаления непрореагировавшей перекиси. Затем к раствору Hb-Fe<sup>4+</sup>=O добавляли 0,12 мМ соли Ангели в соотношении 1 : 1 в расчете на субъединицы белка и наблюдали за восстановлением Hb-Fe<sup>4+</sup>=O до metHb по спектрам поглощения в диапазоне 450-700 нм. При этом происходило уменьшение поглощения при 541 и 582 нм и увеличение при 631 нм. Состав реакционной смеси: 0,03 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4), 0,4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,12 мМ соли Ангели.

Влияние соли Ангели на образование Hb-Fe<sup>4+</sup>=O также исследовали в системе с гидропероксидом *трет*-бутила. В этом случае к 0,03 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли 0,71 мМ *t*-ВООН в соотношении 6 : 1 в расчете на субъединицы белка. Соль Ангели вносили одновременно с *t*-ВООН в концентрации 0,4 мМ, что соответствует соотношению 3 : 1 в расчете на субъединицы белка. За накоплением Hb-Fe<sup>4+</sup>=O следили по разности поглощения при 582 нм (один из максимумов поглощения оксоферрилHb) и 617 нм (ближайшая к максимуму изобестическая точка).

### ***Окисление TMPD***

Продукцию АФК в реакции гемоглобина с *t*-ВООН измеряли в присутствии *N,N,N',N'*-tetramethylbenzene-1,4-diamine (TMPD) [Feng et al.,

2005]. К раствору 0,03 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) с 0,12 мМ TMPD добавляли *t*-BOOH до конечной концентрации 0,28 мМ и измеряли оптическое поглощение при 610 нм. Донор нитроксила соль Ангели вносили в реакционную смесь до конечных концентраций 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8 мМ. Для оценки уровня генерации окислителей использовали показатель – площадь под кривой окисления TMPD, зарегистрированной в течение 5 минут.

### ***Окисление DCFH***

Продукцию АФК также измеряли с помощью флуоресцентного реагента 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH), который в реакции с АФК образует реакционноспособный интермедиат, взаимодействующий с молекулярным кислородом с образованием супероксида и стабильного флуоресцентного соединения DCF, который обнаруживает флуоресценцию при  $\lambda_{\text{возб}}=485-500$  нм и  $\lambda_{\text{исп}}=515-530$  нм [Chen et al., 2010]. Реакционная смесь содержала 0,03 мМ metHb, 0,6 мМ DCFH и 0,71 мМ *t*-BOOH в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут в присутствии и в отсутствии соли Ангели. Измерение проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301-PC (Япония) в микрокювете на 0,5 мл при медленной скорости сканирования, высокой чувствительности, ширине щели возбуждающего и испускающегося света 3 нм.

### ***Регистрация спиновых аддуктов DEPMPO со свободными радикалами***

Образование органических свободных радикалов при взаимодействии гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила регистрировали с помощью спектроскопии ЭПР. В качестве спиновой ловушки использовали DEPMPO (конечная концентрация 75 мМ), образующей аддукты со свободными радикалами. Реакционная смесь содержала 0,3 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) и 2 мМ *t*-BOOH. Для изучения антиоксидантного эффекта нитроксильного аниона к раствору гемоглобина вначале добавляли соль Ангели до конечной концентрации 12 мМ и только затем *t*-BOOH.



Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре через 5 мин после смешивания компонентов.

### **2.19. Выращивание клеток *Escherichia coli* (раздел 3.3.2.)**

В работе были использованы клетки *Escherichia coli* штамм ТВ-1. Клеточную суспензию (1 мл), хранившуюся в растворе глицерина при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , высевали в жидкую среду LB и культивировали в течение 15 часов при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  на термошейкере фирмы «Биоком» (Россия) с частотой орбитального движения 200 об/мин до оптической плотности при 600 нм ( $\text{OD}_{600}$ ) = 0,096 ед. Полученную таким образом культуру использовали для засева серии колб объемом 350 мл, содержащих 60 мл жидкой среды LB (~83% объема колбы заполнено воздухом) и 150 мл (~57% объема колбы заполнено воздухом) до  $\text{OD}_{600}$  = 0,02÷0,03 ед. В начале логарифмической фазы роста ( $\text{OD}_{600}$  = 0,12÷0,15 ед.), через два часа после начала культивирования, вносили раствор MG до конечной концентрации 3 мМ и/или кислоту Пилоти до конечной концентрации 1 мМ, длительно высвобождающую HNO. Концентрацию клеток в культуре измеряли через каждые 2 часа по величине  $\text{OD}_{600}$  в 1 мм кювете. Через 8 часов (в середине логарифмической фазы роста) производили отбор бактериальной культуры для оценки жизнеспособности клеток (МТТ-тест). Через 24 часа (в стационарной фазе) отбирали клетки для получения белкового экстракта с целью оценки флуоресцирующих КПП.

### **2.20. Получение белкового экстракта из клеток *E. coli*. (раздел 3.3.2.)**

Белковый экстракт получали из 24-часовой бактериальной культуры. Суспензию бактерий (1 мл) отмывали от компонентов питательной среды трехкратным центрифугированием (10000 g, 5 мин) в 0,1 М К-фосфатном буфере (pH 7,4) и нормировали до  $\text{OD}_{600}$  = 0,24 ед. К отмывтой суспензии клеток добавляли лизоцим (20 мкг/мл) и инкубировали в течение часа при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Затем клетки разрушали ультразвуком (три цикла по 1 мин) на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 (MSE, Великобритания) при частоте 23 кГц,

охлаждая образцы между циклами. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g для получения фракции растворимых белков.

### **2.21. Измерение флуоресценции растворимых белков из клеток *E. coli*. (раздел 3.3.2.)**

В супернатанте, полученном, как описано выше (п. 2.20), регистрировали автофлуоресценцию при  $\lambda_{\text{возб}} = 325$  нм и  $\lambda_{\text{исп}} = 490$  нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5302 PC (Япония) в микрокювете на 0,5 мл при медленной скорости сканирования, высокой чувствительности (по маркировке прибора), ширине щели возбуждающего и испускающего света 5 нм.

### **2.22. Определение жизнеспособности клеток *E. coli*. (раздел 3.3.2)**

Жизнеспособность клеток оценивали по скорости восстановления дифенилтетразолий бромида (МТТ) в нерастворимый формазан. К 100 мкл культуры клеток (8 часов роста) в 0,4 мл среды LB добавляли 0,1 мл МТТ (5 мг/мл) и инкубировали при 37 °С в течение часа. Образовавшиеся кристаллы формазана отделяли центрифугированием при 13000 g в течение 5 мин и растворяли в 0,5 мл изопропанола. Количество формазанов определяли спектрофотометрически, используя коэффициент миллимолярной экстинкции  $\varepsilon_{560} = 7,2 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Перед регистрацией образцы разбавляли в 10 раз в изопропаноле. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 300 (VarianBio, США) в кювете с длиной оптического пути 1 см.

### **2.23. Окисление дигидрородамина пероксинитритом (раздел 3.1.2.)**

При распаде 3-морфолино-сиднонимина (SIN-1) образуется пероксинитрит [Singh et al., 1999], который окисляет дигидрородамин (DHR123) в родамин. Накопление последнего регистрировали по оптическому поглощению при 500 нм ( $\varepsilon = 78\ 800 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ ) [Crow, 1997]. Перед

экспериментом готовили 20 мМ растворы SIN-1 и DHR123 в DMSO. Реакционная среда содержала 2,7 мМ DHR123 и 2,7 мМ SIN-1 в 20 мМ Na,K-фосфатном буфере (рН 7,4). ДНКЖ вносили в реакционную смесь через 5 минут после начала реакции. Кинетику окисления DHR123 записывали в 1 мм кювете в течение 10 минут при комнатной температуре на UV-VIS спектрофотометре Cary 300 (VarianBio, США). Скорость окисления дигидрородамина оценивали по углу наклона линейного участка кинетической кривой.

#### **2.24. Определение восстановленных тиоловых групп (раздел 3.1.2.)**

Количественную оценку сульфгидрильных групп проводили с помощью тиол-специфичного флуоресцентного реагента ThioGlo1 (3Н-нафтол[2,1-*b*]пиран-*s*-карбоновая кислота), который при добавлении к раствору белка образует тиоловый аддукт с  $\lambda_{\text{исп}} = 500$  нм при  $\lambda_{\text{возб}} = 379$  нм [Hoff et al., 2013].

При измерении содержания SH-групп в образцах низкомолекулярных тиолов и ДНКЖ, образованных с их участием, реакционная смесь содержала 0,08 мМ ДНКЖ (по  $\text{Fe}^{2+}$ ) или эквивалентное количество тиола в 100 мМ K-фосфатном буфере (рН 7,4) и 0,8 мМ  $\text{ONOO}^-$  (10:1) или 2 мМ *t*-BOOH (25:1) / 0,2 мМ (2,5:1).

Для анализа SH-групп образцы готовили следующим образом: к 5 мкл реакционной смеси, добавляли 5 мкл 0,5 мМ раствора ThioGlo1 в DMSO и инкубировали 3 мин. Затем полученный раствор (10 мкл) вносили в спектрофлуориметрическую кювету, содержащую 490 мкл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,4). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) со средней скоростью сканирования и высокой чувствительностью (в соответствии с обозначениями на приборе). Флуоресценцию регистрировали при 379 нм. Ширина щели возбуждающего и испускаемого света составляла 3 нм.

## **2.25. Окислительная модификация бычьего сывороточного альбумина (раздел 3.1.2.)**

Окислительную модификацию БСА осуществляли добавлением к 0,15 мМ раствору белка пероксинитрита в молярном соотношении 10:1 и гидропероксида *трет*-бутила в молярном соотношении 25:1. По истечении 10 минут для ONOO<sup>-</sup> и 20 минут для *t*-BOOH образцы БСА анализировали на количество SH-групп и высокомолекулярных агрегатов с помощью SDS-электрофореза в ПААГ.

## **2.26. Статистическая обработка**

Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием программных пакетов SPSS (SPSS: An IBM Company) и выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). При сравнении численных значений использовались *t*-тест Стьюдента и ANOVA, разница считалась значимой при  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Антиоксидантное действие ДНКЖ с различными лигандами при окислении белков и липидов в модельных системах

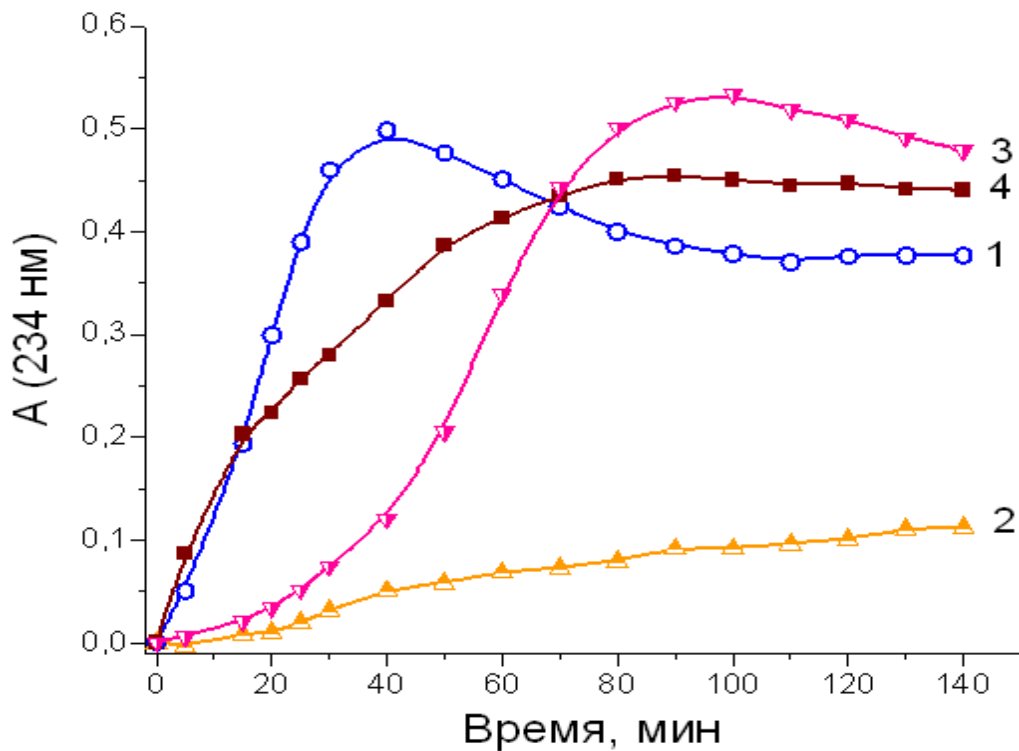
#### 3.1.1. Антиоксидантное действие глутатионовых ДНКЖ при перекисном окислении липидов

Известно, что патогенез многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, в первую очередь атеросклероза, связан с окислительной модификацией липопротеидов низкой плотности (ЛНП) [Ланкин, 2000, 2001]. У животных с искусственно созданным атеросклерозом в аорте было обнаружено повышенное содержание продуктов свободнорадикального окисления, в том числе гидропероксидов липидов. Окисление липидной части ЛНП приводит также к нарушению конформации белков, входящих в состав ЛНП. Частицы окисленных ЛНП активно поглощаются макрофагами, что в последствии приводит к образованию «пенистых клеток». Это негативно сказывается на состоянии сосудов и других тканей.

Окислительный и карбонильный стресс способствуют процессам окисления липидов в биомембранах и ЛНП плазмы крови [Shabalala et al., 2022]. Литературные данные подтверждают важную роль свободнорадикальных процессов в патогенезе сахарного диабета II типа, что наводит на мысль об общих механизмах свободнорадикальных повреждений при атеросклерозе и сахарном диабете [Lankin et al., 2022]. По мнению многих исследователей основное медикаментозное лечение больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, в том числе ишемической болезнью сердца, должно быть направлено на подавление окислительного и карбонильного стрессов [Tikhaze et al, 2020].

В связи с этим мы исследовали влияние глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ) на перекисное окисление липидов в ЛНП, индуцированное ионами меди. Как видно из данных, представленных на рисунке 3.1.1., ДНКЖ в концентрации 20 мкМ эффективно ингибируют перекисное окисление в ЛНП.

Уровень окислительной модификации ЛНП оценивали по концентрации диеновых конъюгатов – продуктов перекисного окисления липидов, имеющих максимум оптического поглощения при 234 нм. Видно, что разные типы ДНКЖ по-разному проявляют себя в процессах, имитирующих ПОЛ. Например, GS-ДНКЖ оказались значительно более эффективны, чем восстановленный глутатион (GSH) в той же концентрации. Фосфатные ДНКЖ (ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ ) в начале реакции проявляли антиоксидантные свойства, но позже в незначительной степени ингибировали окисление ЛНП, что может быть обусловлено слабой стабильностью этих комплексов.



**Рисунок 3.1.1.** Влияние GS-ДНКЖ и ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  и GSH на индуцированное медью перекисное окисление липидов в ЛНП, полученных из крови человека. Концентрация ДНКЖ – 20 мкМ, GSH – 40 мкМ и  $\text{Cu}^+$  – 30 мкМ. 1 – контроль, 2 – GS-ДНКЖ, 3 – ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ , 4 – GSH.

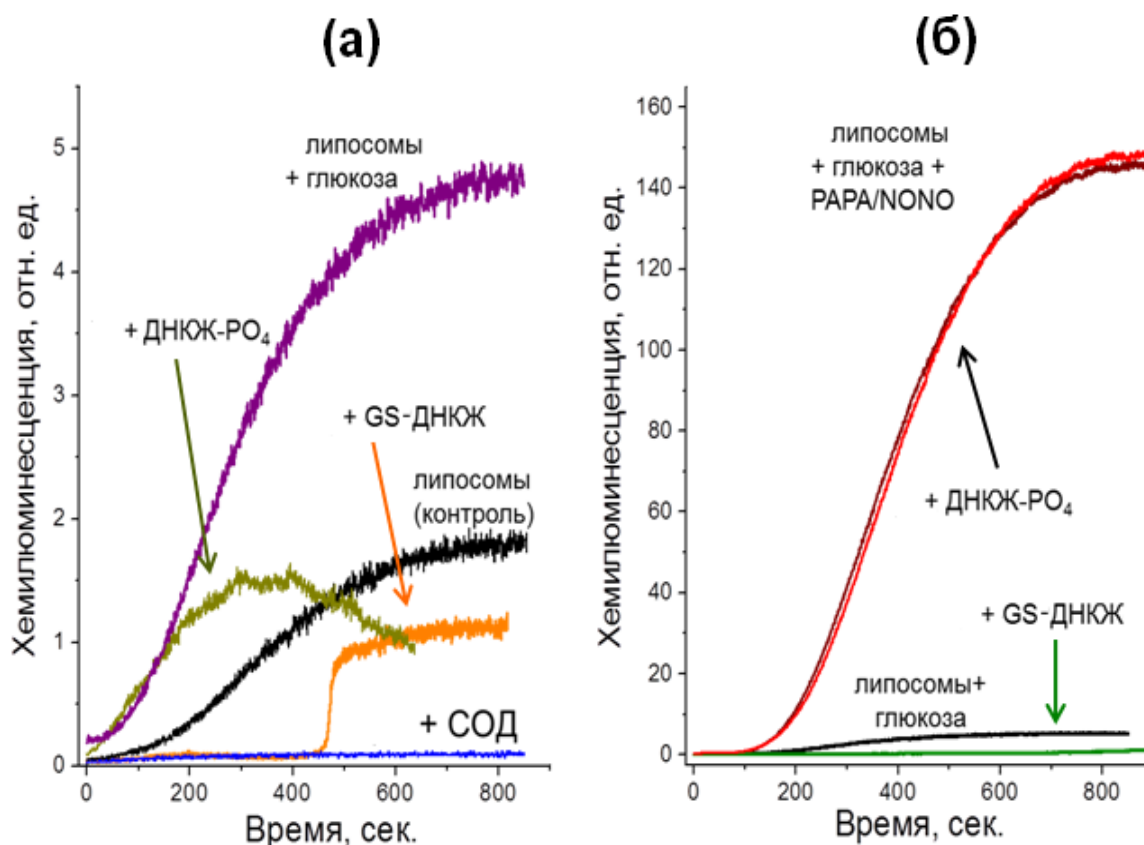
Модификация биополимеров под действием активных форм кислорода и активных карбонильных соединений наблюдается также при диабетической гипергликемии, т.е. в условиях карбонильного стресса. Мы разработали систему, моделирующую процессы перекисного окисления в этих условиях.

На рисунке 3.1.2. а представлены кинетики окисления липосом, стимулируемого глюкозой. С помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции было исследовано влияние ДНКЖ с глутатионовыми и фосфатными лигандами на соокисление липосом и глюкозы.

В реакционной среде, содержащей липосомы и глюкозу, GS-ДНКЖ существенно увеличивали лаг-период хемилюминесценции и снижали её максимальную интенсивность (рисунок 3.1.2. а, оранжевая кривая). Фосфатные ДНКЖ не влияли на лаг-период, но также уменьшали интенсивность хемилюминесценции (рисунок 3.1.2. а, зеленая кривая). Эти данные свидетельствуют об эффективном ингибировании динитрозильными комплексами железа соокисления липидов и глюкозы.

Интересно, что свободный NO, выделяемый при распаде синтетического донора оксида азота PAPA/NONO, резко стимулировал хемилюминесценцию в используемой модельной системе (рисунок 3.1.2. б, черная кривая). Фосфатные ДНКЖ практически не влияли на кинетику хемилюминесценции в реакционной среде, которая содержала PAPA/NONO, липосомы и глюкозу (рисунок 3.1.2. б, красная кривая). В то же время GS-ДНКЖ ингибировали процессы свободнорадикального окисления в этой системе не менее эффективно, чем в реакционной среде, содержавшей только глюкозу и липосомы.

Необходимо отметить, что в модели соокисления липидов и глюкозы продуцируется супероксидный радикал, поскольку хемилюминесценция в этих условиях ингибируется СОД (рисунок 3.1.2. а, синяя кривая). В реакции NO с супероксидом должен продуцироваться пероксинитрит, что объясняет рост хемилюминесценции в среде, в которой соокисление происходит в присутствии донора оксида азота. На основании полученных результатов можно предположить, что глутатионовые лиганды ДНКЖ важны для нейтрализации пероксинитрита.

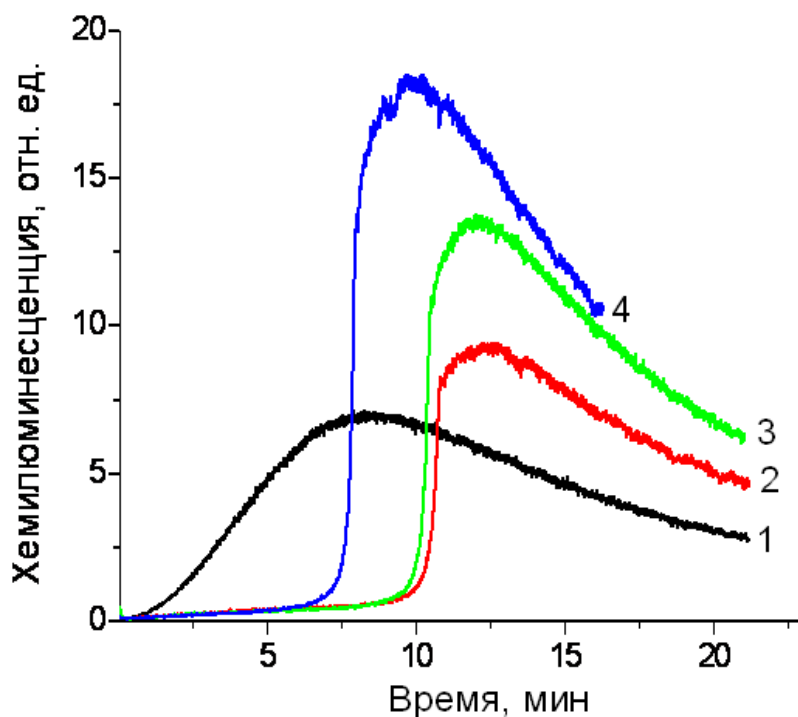


**Рисунок 3.1.2. Влияние ДНКЖ с различными лигандами (GS-ДНКЖ, ДНКЖ-РО<sub>4</sub><sup>-</sup>), свободного NO, цистеина и метилглиоксаля на зависимую от люминола хемилюминесценцию в условиях соокисления липосом и глюкозы.** Свободнорадикальное окисление липосом из яичного фосфатидилхолина индуцировали гидрофобным азоинициатором AIBN. Концентрация ДНКЖ составляла – 70 мкМ; донора оксида азота PAPA/NONO – 0,2 мМ, фосфатидилхолина и азоинициатора по 1,4 мМ, глюкозы – 25 мМ.

Также влияние ДНКЖ на процессы ПОЛ изучалось в системе, содержащей мицеллы ПНЖК и азоинициатор AIBN. В ходе разложения азоинициатора, высвобождаются органические радикалы, индуцирующие процессы ПОЛ. Методом люминол-зависимой хемилюминесценции было показано, что количество образовавшихся липидных радикалов меняется при добавлении GS-ДНКЖ (рисунок 3.1.3). А именно, появляется значительный лаг-период хемилюминесценции, причем он растет с увеличением концентрации ДНКЖ. Это свидетельствует о полном подавлении образования радикалов липидов в течение длительного времени, что указывает на сильные



антиоксидантные свойства комплексов в этой системе. Однако максимальная интенсивность хемилюминесценции превышает таковую в контроле. Такое отличие действия GS-ДНКЖ в этой системе от модельных систем с ЛНП и липосомами может быть обусловлено взаимодействием ДНКЖ с пероксидами или свободными радикалами липидов.



**Рисунок 3.1.3. Влияние GS-ДНКЖ на хемилюминесценцию в ходе перекисного окисления мицелл из линоленовой кислоты.** Перекисное окисление индуцировалось AIBN. Реакционная среда содержала – 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,6), 2 мМ линоленовой

кислоты и 1 мМ азоинициатора. 1 – контроль (без добавок), 2 – 50 мкМ GS-ДНКЖ, 3 – 34 мкМ GS-ДНКЖ, 4 – 17 мкМ GS-ДНКЖ.

### 3.1.2. Действие прооксидантов на тиоловые лиганды ДНКЖ

Низкомолекулярные тиолы (цистеин, глутатион и др.) в составе ДНКЖ могут подвергаться действию прооксидантов, в результате чего комплексы разрушаются, высвобождая  $Fe^{2+}$ . Это затрудняет использование лекарственных форм, содержащих ДНКЖ (препараты для инъекций, ингаляций и т.д.). Такие препараты в организме могут быстро разрушаться, не успев оказать нужного терапевтического действия. Поэтому была поставлена задача изучить действие гидропероксида *трет*-бутила и пероксинитрита на окисление тиолатных лигандов, входящих в состав низкомолекулярных

ДНКЖ (ДНКЖ с глутатионом, цистеином и липоевой кислотой) и белковых (ДНКЖ с бычьим сывороточным альбумином).

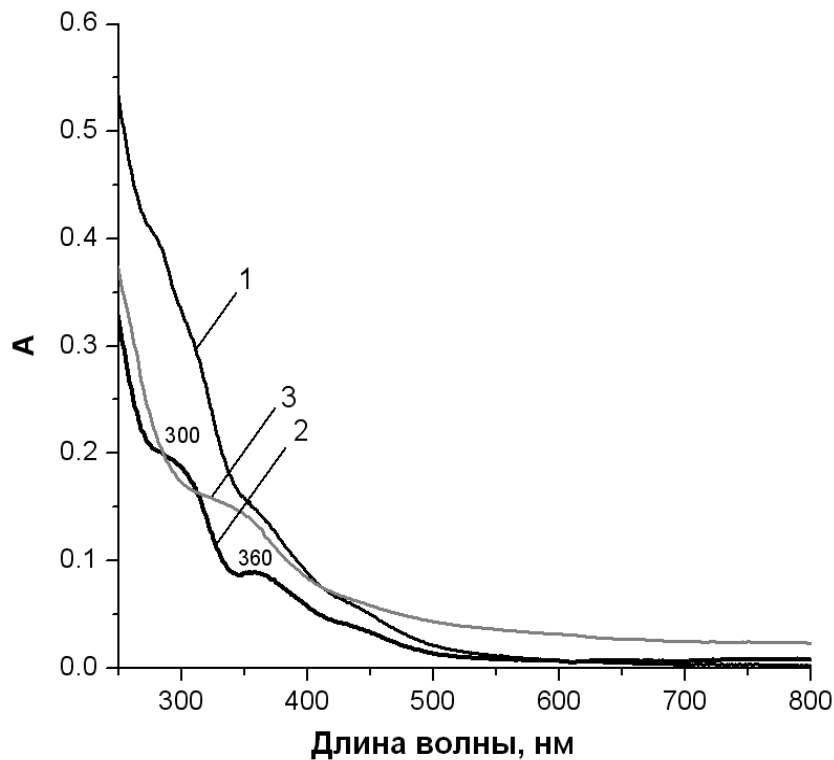
Пероксинитрит и гидропероксид *трет*-бутила были выбраны в качестве окислительных агентов, которые позволяют моделировать нитрозативный и окислительный стресс. В условиях нитрозативного стресса, например, при «дыхательном взрыве нейтрофилов», пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) образуется в реакции оксида азота с супероксидным анион радикалом [Pacher et al., 2007], тогда как гидропероксид *трет*-бутила является аналогом органических гидропероксидов, образующихся при перекисном окислении липидов.

#### ***Характеристика ДНКЖ с тиоловыми лигандами***

С помощью метода оптической спектрофотометрии были исследованы низкомолекулярные ДНКЖ, содержащие в качестве тиоловых лигандов *N*-ацетилцистеин (AcCys), глутатион (GSH) и липоевую кислоту (LA). В водных растворах при нейтральном pH тиоловые ДНКЖ существуют в виде парамагнитных моноядерных (М-ДНКЖ) и диамагнитных биядерных комплексов (Б-ДНКЖ) (рисунок 3.1.4), причем доля последних составляет до 50% от общего пула ДНКЖ [Vanin et al., 2010; Vanin, 2016].

Спектры оптического поглощения RS-ДНКЖ представлены на рисунок 3.1.4. Анализ спектров позволяет предположить, что используемые в работе растворы ДНКЖ действительно содержат существенную долю биядерной формы. На это указывает наличие на спектрах максимумов в области 310 и 360 нм, которые характерны для Б-ДНКЖ с глутатионом и цистеином [Vanin et al., 2010].

Также было определено количество свободных тиолов в растворах ДНКЖ по флуоресценции с ThioGlo1. AcCys-ДНКЖ содержали 7,3 % тиолов, GS-ДНКЖ – 11,1 % и LA-ДНКЖ – 1,3 %.

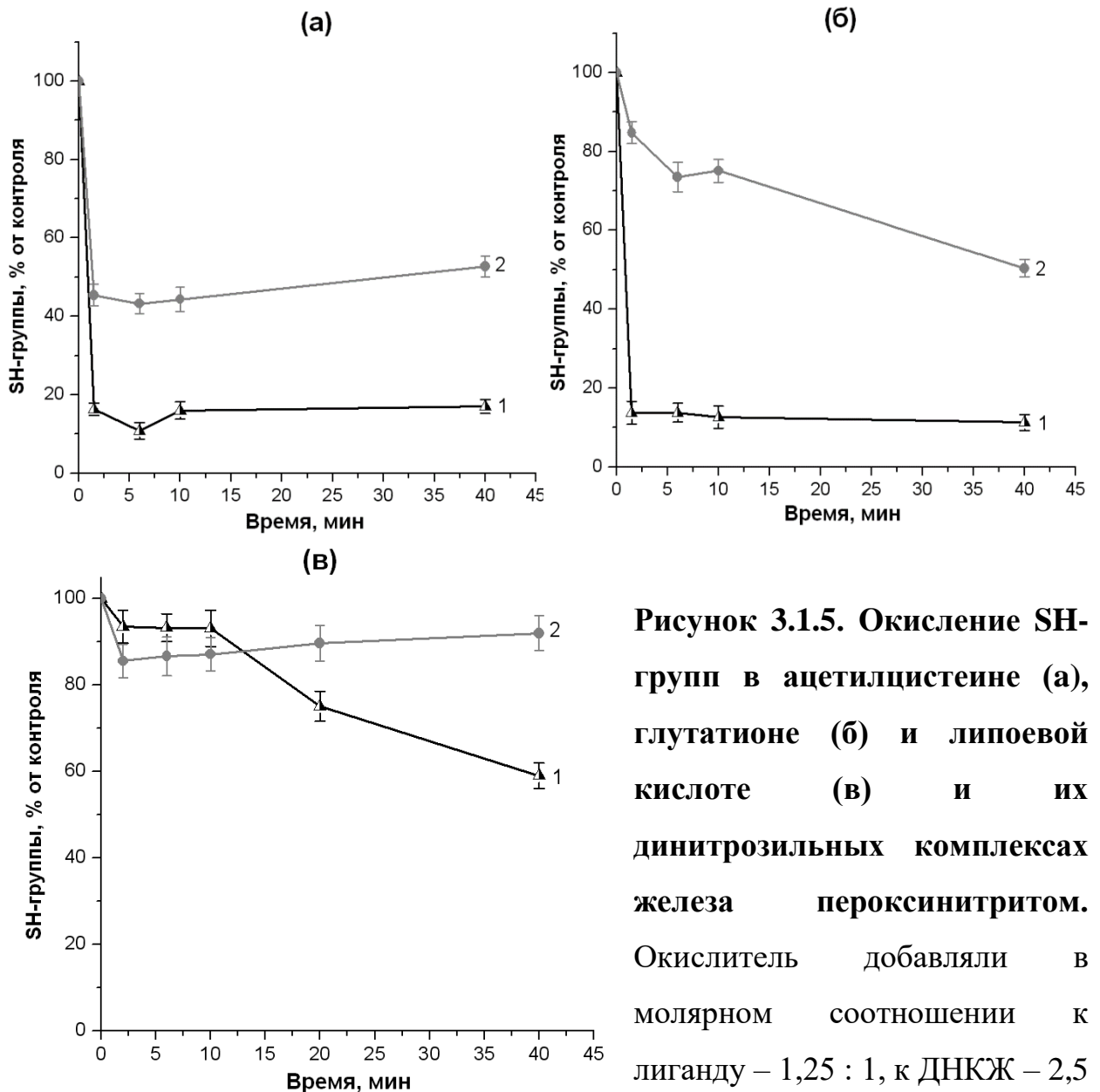


**Рисунок 3.1.4.**  
**Спектры поглощения**  
**низкомолекулярных**  
**ДНКЖ с тиоловыми**  
**лигандами. 1 – AcCys-**  
**ДНКЖ, 2 – GS-ДНКЖ,**  
**3 – LA-ДНКЖ.**

***Окисление тиоловых групп, входящих в состав ДНКЖ и их лигандов***

Для того чтобы понять, насколько тиоловые лиганды в составе ДНКЖ устойчивы к окислению, к растворам комплексов добавляли пероксинитрит и гидропероксид *трет*-бутила. Затем, в течение 40 минут регистрировали кинетику окисления SH-групп с помощью флуоресценции тиолового аддукта с ThioGlo1.

В AcCys и GSH тиоловые группы практически полностью окислялись уже в первые пять минут (рисунок 3.1.5. а и б, кривые 1). В случае, когда AcCys и GSH были включены в комплексы, количество детектируемых SH-групп к концу измерения достигало примерно половины от исходного уровня (рисунок 3.1.5. а и б, кривые 2). Несколько иная ситуация наблюдалась при окислении ДНКЖ, содержащих липоевую кислоту. Окисление тиолов в LA-ДНКЖ было на уровне 10 %, в то время как в липоевой кислоте уровень окисления тиолов к концу измерения достигал 40% (рисунок 3.1.5. в).



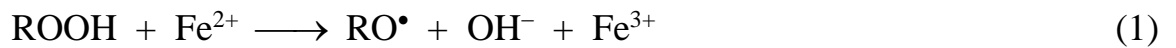
**Рисунок 3.1.5. Окисление SH-групп в ацетилцистеине (а), глутатионе (б) и липоевой кислоте (в) и их динитрозильных комплексах железа пероксинитритом.**

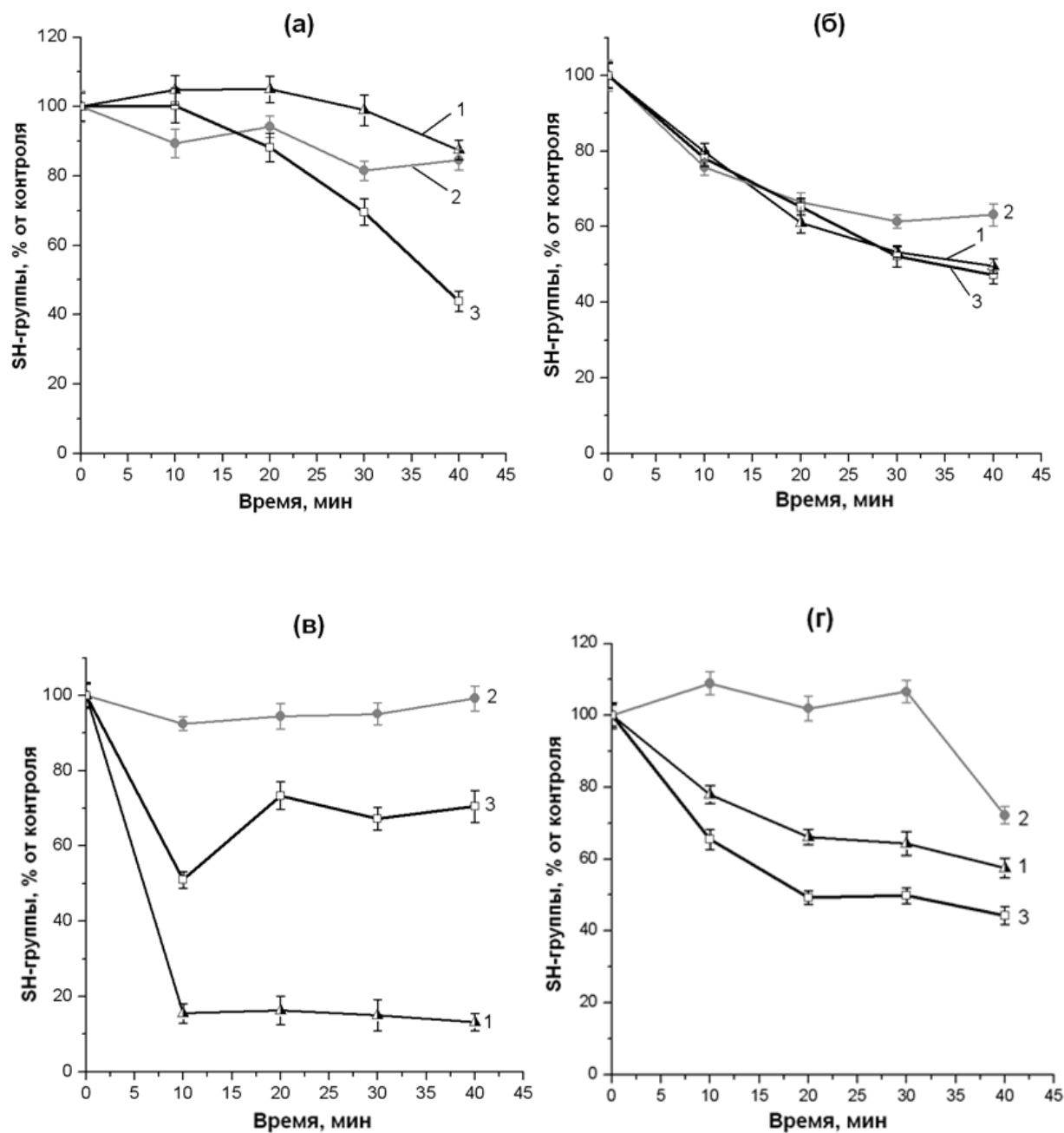
Окислитель добавляли в молярном соотношении к лиганду – 1,25 : 1, к ДНКЖ – 2,5 : 1. 1 – лиганд, 2 – ДНКЖ. Состав реакционной смеси: 0,08 мМ ДНКЖ (по  $\text{Fe}^{2+}$ ) или эквивалентное количество тиола в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и 0,8 мМ  $\text{ONOO}^-$  (1:10).

Тиолсодержащие ДНКЖ и их лиганды по отношению к *t*-VOOH оказались менее реакционноспособны. Этот факт согласуется с данными работы [Lobysheva et al., 1999], в которой показано, что реакция перекиси водорода с тиолсодержащими ДНКЖ протекает в 600 раз медленнее реакции с пероксинитритом. В наших экспериментах при молярном соотношении ДНКЖ : *t*-VOOH равном 1 : 25 тиоловые лиганды в AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ

окислялись практически также как и в AcCys и GSH (рисунок 3.1.6. а и б). Причем в кинетиках окисления GS-ДНКЖ и GSH значимых отличий не было (рисунок 3.1.6. б). Однако при инкубации их с более низкой концентрацией органического гидропероксида (GS-ДНКЖ : *t*-BOOH = 1 : 2,5) удалось зарегистрировать защитное действие ДНКЖ на тиоловые группы (рисунок 3.1.6. г). Добавление в реакционную смесь к GSH ионов Fe<sup>2+</sup> в концентрации, эквивалентной их содержанию в комплексах, усиливало окисление тиолов (рисунок 3.1.6. г, кривая 3). Этот факт служит еще одним доказательством того, что ионы Fe<sup>2+</sup> в комплексе с NO не проявляют прооксидантное действие. Вместе с тем, окисление тиоловых лигандов в LA-ДНКЖ не происходило, в то время как LA окислялась практически полностью (рисунок 3.1.6. в).

Интересно, что при высокой концентрации *t*-BOOH ионы железа не влияют на окисление глутатиона, стимулируют окисление *N*-ацетилцистеина и ингибируют окисление липоевой кислоты. В реакционной среде, содержащей ионы Fe<sup>2+</sup>, органические гидропероксиды и тиолы, в основном происходят следующие реакции [Tien et al., 1982; Olson et al., 2018]:





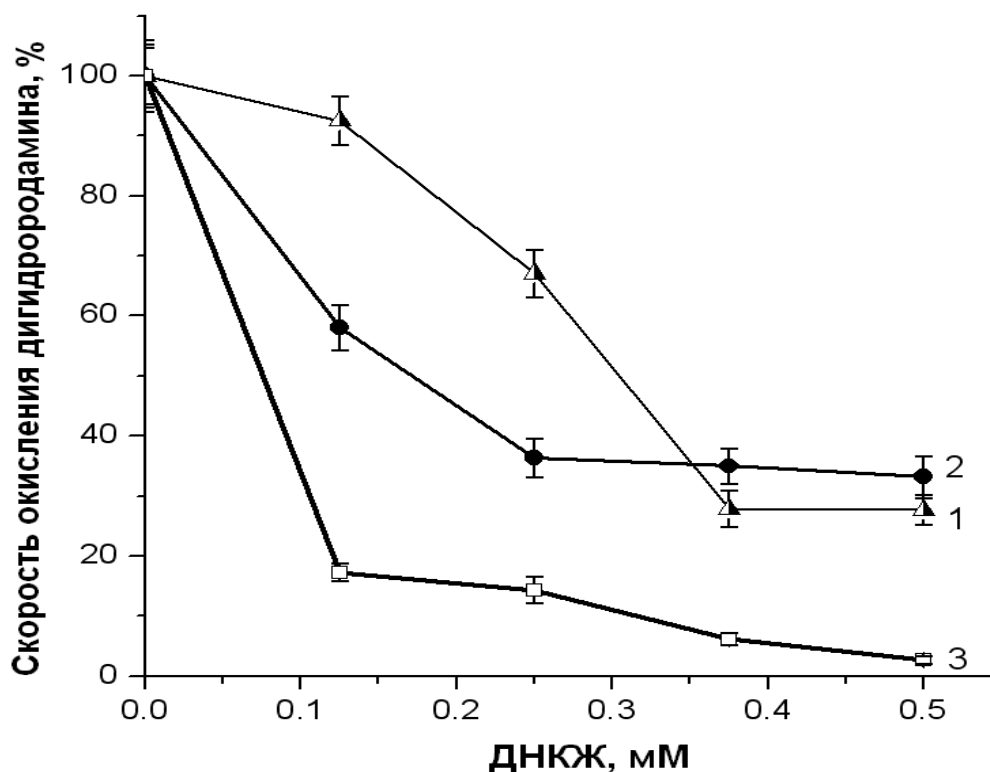
**Рисунок 3.1.6. Окисление SH-групп в ацетилцистеине (а), глутатионе (б) и липоевой кислоте (в) и соответствующих ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила. Окислитель добавляли в молярном соотношении к лиганду – 12,5 : 1, к ДНКЖ – 25 : 1. (г) – окисление SH-групп в глутатионе и глутатионовых ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила (молярное соотношение к лиганду – 1,25 : 1, к ДНКЖ – 2,5 : 1). Концентрация Fe<sup>2+</sup> в (а), (б) и (в) – 0,16 мМ и в – (г) 0,08 мМ. 1 – лиганд, 2 – ДНКЖ, 3 – лиганд + Fe<sup>2+</sup>. Концентрация *t*-ВООН 2 мМ (25 : 1) / 0,2 мМ (2,5 : 1).**

Основную роль в процессах перекисного окисления липидов и других биомолекул играют реакции 1 и 2, в которых образуются алкоксильные ( $\text{RO}^\bullet$ ) и алкилперекисные радикалы ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Следует отметить, что реакции 1 и 2 будут происходить и в присутствии примесных ионов железа, т.е. без дополнительного введения последних в среду. В реакции 4 тиолы выступают в качестве антиоксидантов восстанавливая эти радикалы. Тиольные радикалы ( $\text{R}'\text{S}^\bullet$ ), которые являются продуктами реакций 3 и 4, далее рекомбинируют с образованием дисульфидов (реакция 5). Уровень окисления тиоловых групп будет зависеть от соотношения компонентов реакционной среды и реакционной активности самих тиолов. Так, при высоком содержании *t*-BOOH увеличение концентрации тиолов в ряду LA, GSH, *N*-ацетилцистеин приводит к усилению окисления SH-групп. Действительно, тиолы могут стимулировать ПОЛ, восстанавливая ионы  $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$  [Tien et al., 1982]. Вместе с тем, связывание ионов железа в ДНКЖ является одним из основных механизмов их антиоксидантного действия. Можно предположить, что при инкубации с высокой концентрацией органического гидропероксида AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ распадаются с высвобождением тиолов и ионов железа, в то же время комплекс LA-ДНКЖ, по-видимому, более стабилен и лучше защищает входящие в его состав тиоловые группы (рисунок 3.1.6. в, кривая 2). Нельзя исключить, что этот эффект связан с большей гидрофобностью LA в сравнении с другими тиоловыми лигандами.

#### ***Влияние ДНКЖ на окисление дигидрорамина пероксинитритом***

Способность ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления дигидрорамина (DHR123) пероксинитритом, образующимся при распаде 3-морфолино сиднонимина (SIN-1) [Singh et al., 1999]. Поскольку при спонтанном распаде SIN-1 в присутствии кислорода одновременно образуется  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и NO, SIN-1 часто используют для моделирования образования  $\text{ONOO}^-$  в живых системах [Singh et al., 1999]. Отметим, что скорость этой реакции очень высока.

На рисунке 3.1.7. представлены кинетики окисления пероксинитритом дигидрородамина 123 до родамина. ДНКЖ дозозависимо снижали скорость окисления дигидрородамина. Причем LA-ДНКЖ оказались более эффективными перехватчиками  $\text{ONOO}^-$ . При концентрации ДНКЖ 0,125 мМ AcCys-ДНКЖ снижали скорость окисления DHR123 на 7%, GS-ДНКЖ – на 42% и LA-ДНКЖ – на 83%.



**Рисунок 3.1.7.** Влияние низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на скорость окисления дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции SIN-1. 1 – AcCys-ДНКЖ, 2 – GS-ДНКЖ, 3 – LA-ДНКЖ. За 100 % принята скорость окисления дигидрородамина в контрольном варианте (без добавок ДНКЖ). Реакционная среда содержала 2,7 мМ DHR123 и 2,7 мМ SIN-1 в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4). ДНКЖ вносили в реакционную смесь через 5 минут после начала реакции.

Этот результат можно объяснить реакцией между  $\text{ONOO}^-$  и тиоловыми лигандами. Образующийся в этой реакции тиильный радикал может быстро реагировать с NO-лигандом ДНКЖ в результате чего должен формироваться S-нитрозотиол.



### ***Влияние ДНКЖ на окисление остатка цистеина БСА***

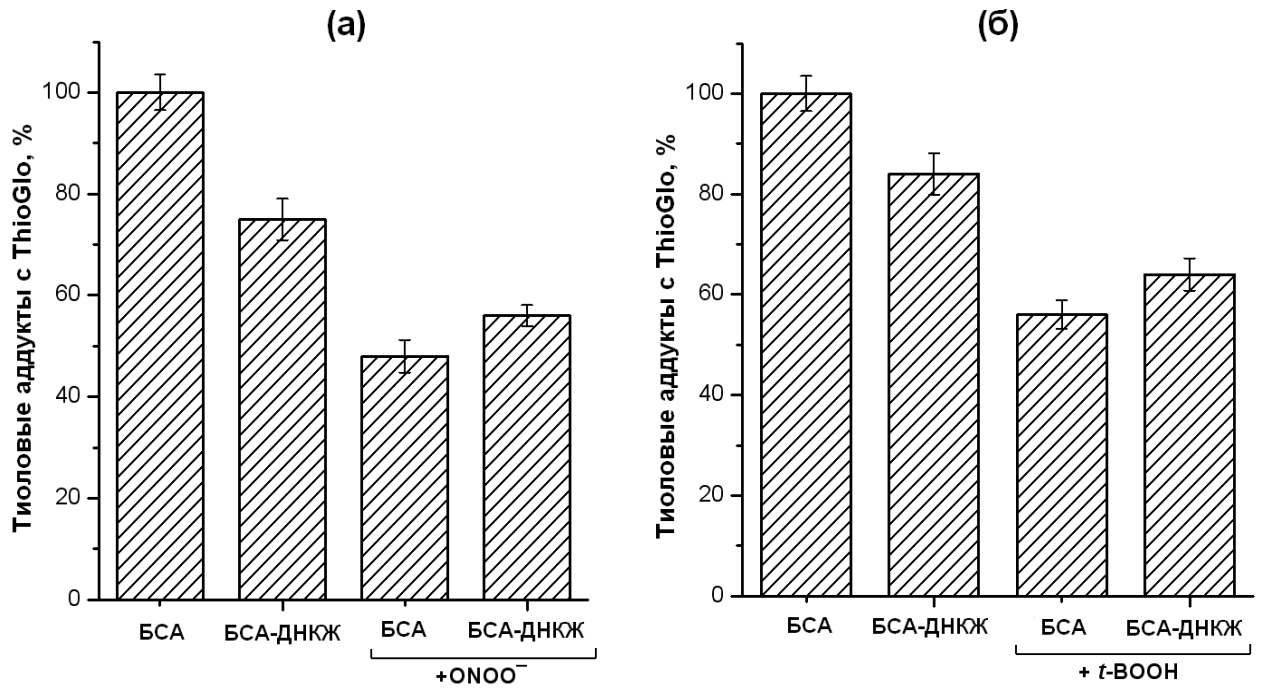
Помимо низкомолекулярных тиолов, основными мишенями действия таких окислителей, как пероксинитрит и гидропероксиды, являются тиоловые остатки в белках [Daiber et al., 2013]. ДНКЖ формируются на белках, как правило, при участии тиоловых групп остатков цистеина [Vanin, 2016], поэтому было проведено исследование влияния ДНКЖ на окисление остатков цистеина в БСА. Нативный БСА содержит один восстановленный остаток цистеина (Cys34). Количественную оценку модификации SH-групп БСА осуществляли с помощью ThioGlo1 [Fabisiak et al., 2002].

В эксперименте использовали ДНКЖ, связанные с цистеином БСА. Для их получения к раствору белка добавляли ДНКЖ с фосфатными лигандами, которые быстро распадаются с переносом железо-нитрозильного фрагмента  $[\text{Fe}^{2+}-(\text{NO})_2]$  на белковый тиол. Интенсивность флуоресценции тиолового аддукта БСА-ДНКЖ была примерно на 20% ниже, чем у интактного белка (рисунок 3.1.8. а). Это можно объяснить тем, что включение тиолов в состав комплексов снижает их реакционную способность. Обработка БСА пероксинитритом в молярном соотношении 1 : 10 приводила к окислению 52% цистеинов (рисунок 3.1.8 а, столбик БСА +  $\text{ONOO}^-$ ), по сравнению с неокисленным белком. При этом в образце БСА-ДНКЖ окислялось 44% цистеинов, что на 8 % меньше чем в БСА. Аналогичные результаты были получены и при окислении БСА гидропероксидом *трет*-бутила (рисунок 3.1.8. б). Как и в случае  $\text{ONOO}^-$ , протекторный эффект ДНКЖ был незначителен и составлял те же 8% при сравнении доли окисленных тиолов в БСА и БСА-ДНКЖ.

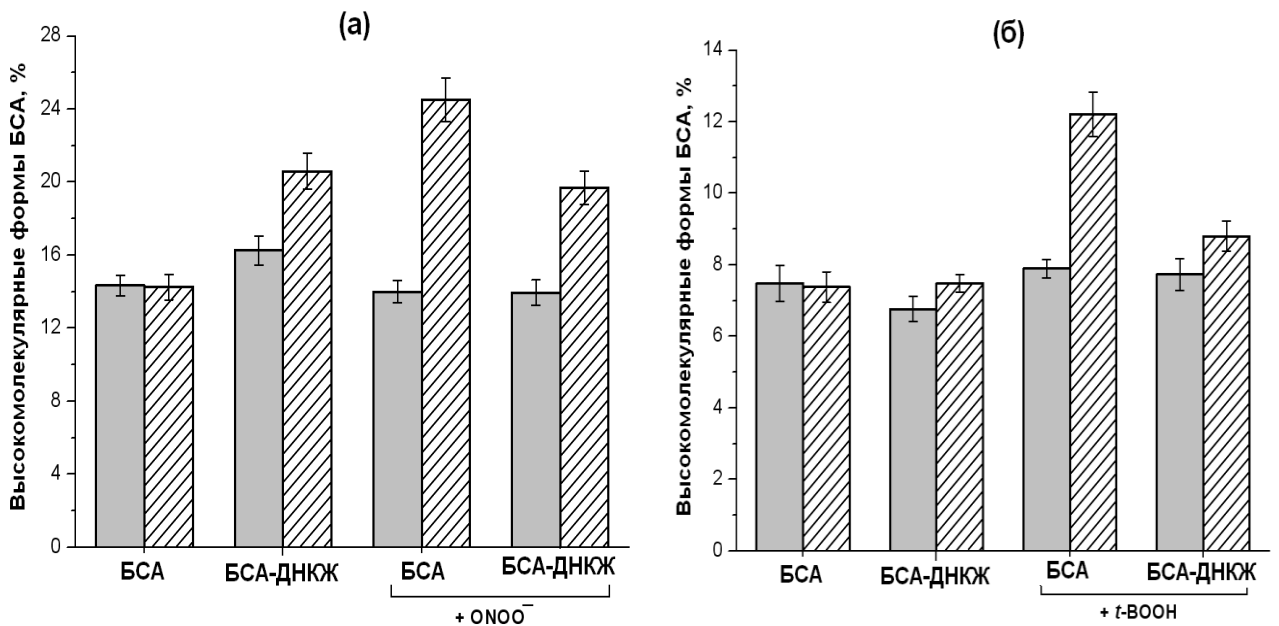
Как известно, окисление остатков цистеина сопровождается образованием сульффиновых и сульфоновых кислот, а также дисульфидных связей. В последнем случае, благодаря межбелковым S-S-сшивкам образуются димеры и более высокомолекулярные агрегаты белка. Образование сшитых с помощью дисульфидных связей форм белка регистрировали методом

денатурирующего SDS-электрофореза в 7%-ном ПААГ. Добавление к образцам белка для электрофореза ДТТ, восстанавливающего дисульфидные связи, выявило, что агрегация белка вызвана именно S-S-сшивками. В присутствии ДТТ количество высокомолекулярных форм, в основном представленных димерами, было примерно одинаково в опытах с воздействием  $\text{ONOO}^-$  – ~14% и с *t*-BOOH – ~7% (рисунок 3.1.9., серые столбцы). В то же время без ДТТ под действием  $\text{ONOO}^-$  количество таких форм в БСА составило 25% (рисунок 3.1.9. а, заштрихованные столбцы), а под действием *t*-BOOH – 12% (рисунок 3.1.9. б, заштрихованные столбцы). Включение тиолов БСА в ДНКЖ снижало с 25 до 19 % долю сшивок под действием  $\text{ONOO}^-$  и с 12 до 9 % под действием *t*-BOOH (рисунок 3.1.9. а и б соответственно, заштрихованные столбцы). Однако практически такое же количество сшивок наблюдалось и в случае неокисленного БСА-ДНКЖ. Это означает, что в процессе подготовки белка для электрофореза комплексы распадались, высвобождая ионы железа, которые индуцировали реакции окисления, в первую очередь остатков цистеина.

Полученные результаты, с одной стороны, демонстрируют незначительное протекторное действие ДНКЖ на белковые тиолы, а, с другой стороны, мы не наблюдали усиления процессов окислительной модификации, которые могли бы происходить в присутствии прооксидантов, образуемых с участием  $\text{Fe}^{2+}$ , содержащегося в комплексах. Это служит еще одним подтверждением низкого прооксидантного действия ДНКЖ по отношению к альбумину и согласуется с результатами более ранних экспериментов, в которых было показано, что ДНКЖ по отношению к гемоглобину действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие входящий в их состав цистеин ( $\beta\text{Cys}93$ ) от окисления [Shumaev et al., 2008].



**Рисунок 3.1.8. Окисление цистеина (Cys34) БСА. Влияние образования БСА-ДНКЖ на окисление Cys34.** Пероксинитрит добавляли к белку в молярном соотношении 10 : 1 (а), гидропероксид *трет*-бутила – 25 : 1 (б).

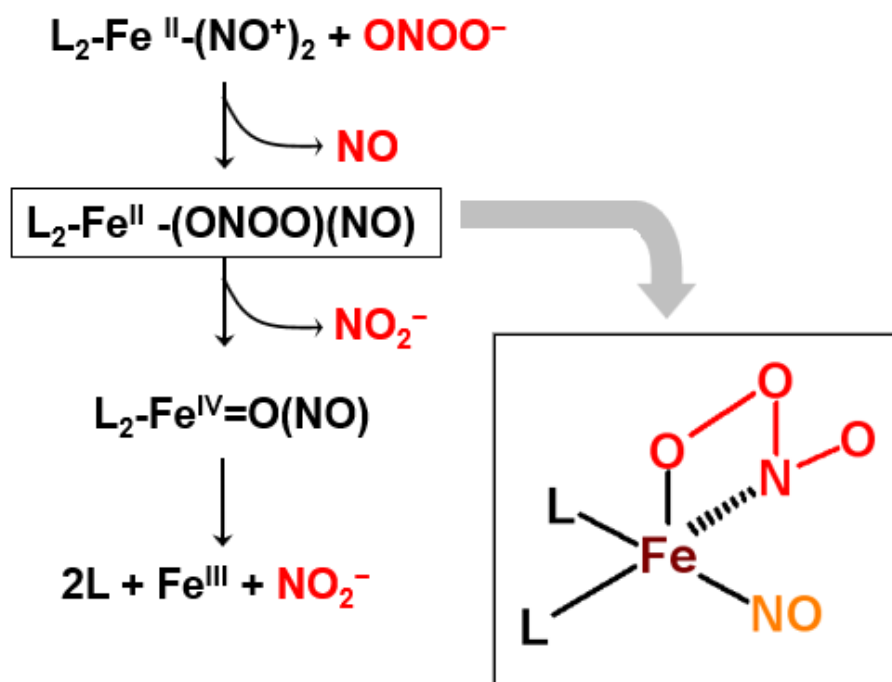


**Рисунок 3.1.9. Влияние ДНКЖ, связанных с БСА, на образование высокомолекулярных форм белка под действием пероксинитрита (а) и гидропероксида *трет*-бутила (б).** По данным SDS-электрофореза в 7% ПААГ. Серые столбики – с добавкой ДТТ, столбики со штриховкой – без ДТТ.

Полученные результаты согласуются с результатами работы [Shumaev et al., 2019], в которой было показано, что ДНКЖ, связанные с альбумином, могут защищать остатки цистеина и гистидина от модификации HOCl. В то же время установлено, что глутатионовые лиганды в ДНКЖ реагируют с HOCl гораздо менее эффективно, чем свободный GSH. Нельзя исключить и тот факт, что в процессе окисления связанных с белками ДНКЖ они могут из моноядерной формы трансформироваться в более стабильную биядерную [Vanin, 2016].

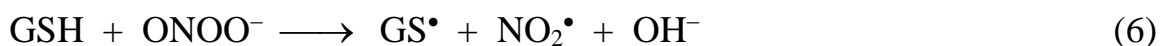
Кроме этого, ранее нами было исследовано влияние ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина. ДНКЖ, связанные с Hb или глутатионом, эффективно защищали этот белок от окисления, вызванного ONOO<sup>-</sup> [Kosmachevskaya et al., 2021] и *t*-BOOH [Shumaev et al., 2008]. Они препятствовали образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, предотвращали разрушение гемовой группы и образование межбелковых сшивок.

Взаимодействие тиолсодержащих ДНКЖ с пероксинитритом было исследовано в работах [Лобышева с соавт., 1999; Shumaev et al., 2008]. Пероксинитрит окисляет GS-ДНКЖ по двухэлектронному механизму ( $k = 1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). В ходе этой реакции образуется интермедиат, содержащий связанный с железом пероксинитрит – (GS)<sub>2</sub>-Fe-(ONOO)(NO) [Лобышева с соавт., 1999; Shumaev et al., 2008; Tran et al., 2011], который распадается с высвобождением нерадикальных продуктов или участвует в нитровании биомолекул [Tran et al., 2011]. Описанная последовательность реакций схематично представлена на рисунке 3.1.10.



**Рисунок 3.1.10.** ДНКЖ катализируют превращение пероксинитрита в нитрат через образование интермедиата, содержащего связанный с железом пероксинитрит. В рамке приведен железо-нитрозильный интермедиат, содержащий пероксинитрит.

Тиоловые лиганды, входящие в состав упомянутых выше интермедиатов, скорее всего, окисляются без образования тиольных радикалов [Шумаев с соавт., 2004]. Это выгодно отличает ДНКЖ от их лигандов, которые в реакции с  $\text{ONOO}^-$  образуют свободнорадикальные продукты [Karoui et al., 1996]:



Помимо протекторного действия на SH-группы, ДНКЖ могут выступать в роли регуляторов реакционной способности белковых тиолов [Космачевская с соавт., 2020].

Результаты данного исследования показали, что тиоловые лиганды, входящие в состав низкомолекулярных ДНКЖ, в меньшей степени подвержены окислению пероксинитритом, чем их несвязанные формы. Это

может быть обусловлено способностью комплексов катализировать разложение пероксинитрита с образованием нетоксичных продуктов, а также с их переходом в более стабильную биядерную форму. При действии на ДНКЖ гидропероксида *трет*-бутила защитное действие наблюдалось только в случае LA-ДНКЖ, что могло быть связано с большей стабильностью и липофильностью этих комплексов. Защитный эффект ДНКЖ на тиоловые группы альбумина был незначителен, однако при этом не происходило роста увеличения окислительных модификаций белка под действием ионов двухвалентного железа, содержащихся в комплексах. Полученные результаты еще раз подтвердили, что координация железом тиоловых лигандов и NO, с одной стороны, защищает тиолы от окисления, а, с другой, снижает прооксидантное действие  $Fe^{2+}$ .

Таким образом, можно заключить, что наличие слабосвязанного железа в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами не является препятствием для использования этих комплексов в биомедицине.

В состав ДНКЖ могут входить не только тиоловые группы цистеина и глутатиона, но и другие анионные и неанионные лиганды различных биополимеров (белков, полисахаридов и т.д.). Связанные с биологически совместимыми полимерами ДНКЖ могут служить основой для создания наночастиц [Akentieva et al., 2023]. Включение ДНКЖ в состав наночастиц значительно повышает стабильность комплексов и увеличивает выход NO в физиологических условиях. Такие наночастицы обеспечивают адресную доставку ДНКЖ в клетки и поэтому могут применяться для лечения рака [Akentieva et al., 2023]. В качестве наночастиц также могут быть использованы липосомы с включенными в них ДНКЖ с гидрофобными лигандами, такими, как липоевая кислота.

Ранее было установлено [Shumaev et al., 2008], что ДНКЖ, ассоциированные с белками (альбумином и гемоглобином), разрушаются активными формами кислорода в меньшей степени, чем низкомолекулярные комплексы. Это указывает на возможность разработки на основе белков

наночастиц ДНКЖ, устойчивых к воздействию активных форм кислорода (супероксида, пероксинитрита, пероксида водорода и др.). Стабильность ДНКЖ по отношению к действию прооксидантов – необходимый критерий для их использования в биомедицине.

### **3.2. Образование ДНКЖ в митохондриях. Роль нитроксила.**

#### **3.2.1. Синтез ДНКЖ с участием S-нитрозотиолов и нитроксила**

Основным источником активных форм кислорода и азота в клетках эукариотических организмов являются митохондрии. Оксид азота в митохондриях генерируется митохондриальной NO-синтазой (mtNOS) [Litvinova et al., 2015]. Известно, что NO, и такие эндогенные метаболиты как ONOO<sup>-</sup> и HNO влияют на активность дыхательной цепи и продукцию активных форм кислорода митохондриями [Litvinova et al., 2015; Iglesias et al., 2015].

По данным Dikalov с соавторами NO в митохондриях превращается в NO<sup>+</sup>, который опосредует посттрансляционные модификации цистеиновых остатков в ДНКЖ или RSNO [Dikalov et al., 2017]. Накопление ДНКЖ и RSNO было показано как во фракции митохондриальной мембраны, так и в митохондриальном матриксе, что свидетельствует о нитрозилировании как низкомолекулярных, так и белковых мишеней. В свою очередь, S-нитрозилирование NADPH-оксидазы снижает продукцию O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [Selemidis et al., 2007; Lin et al., 2012].

Также известно, что в митохондриях содержится ферритин, а супероксидный радикал способствует высвобождению железа из белка. В свою очередь это железо может включаться в нитрозильные комплексы железа. При низком давлении кислорода образование ДНКЖ в митохондриях способствует уменьшению концентрации потенциально токсичных молекул NO и ионов железа. А при реоксигенации образованные ДНКЖ могут выполнять роль антиоксидантов и оказывать цитопротекторное действие [Shumaev et al. 2018].

Вместе с тем, формирование и возможные функции ДНКЖ в митохондриях изучены недостаточно. Неясно также может ли участвовать в образовании этих комплексов нитроксил  $\text{NO}^-$  ( $\text{HNO}$ ).

### ***Синтез ДНКЖ с участием S-нитрозотиолов***

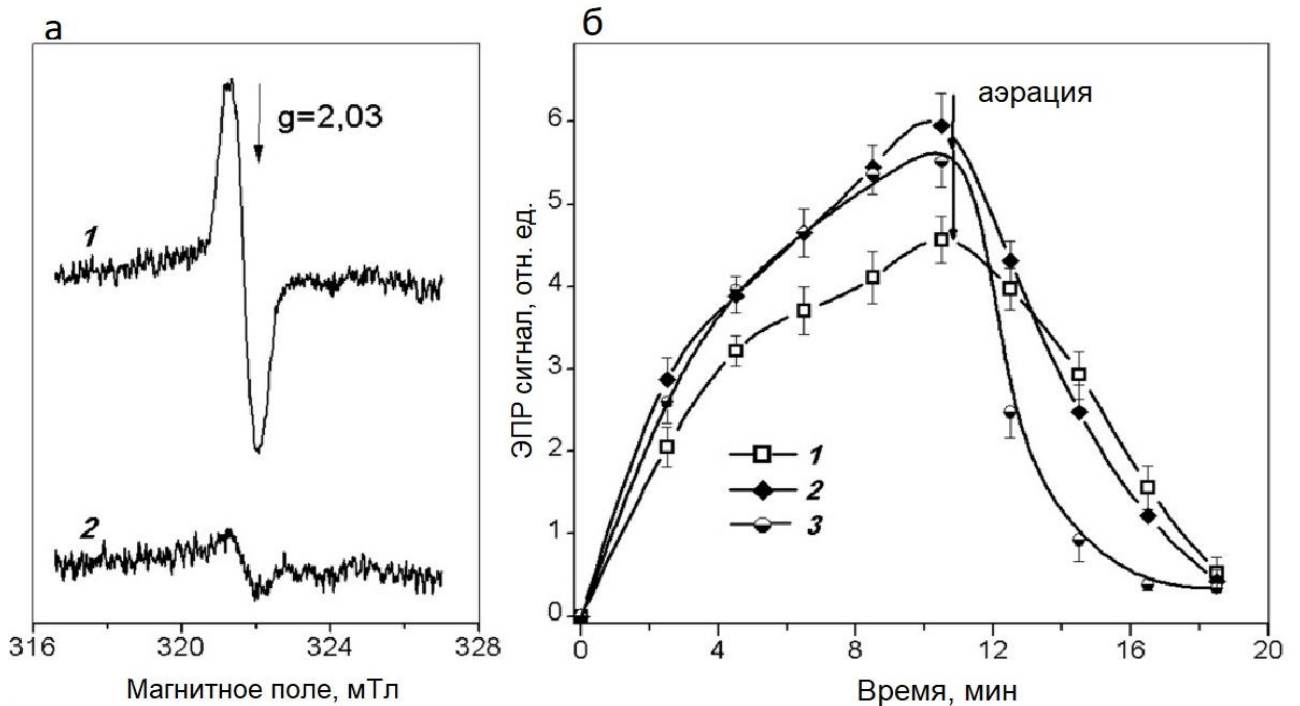
Мы изучали синтез ДНКЖ в изолированных митохондриях, выделенных из сердца крыс, с использованием S-нитрозоцистеина в качестве донора  $\text{NO}$ . В этом эксперименте митохондриальные суспензии содержали экзогенный L-цистеин. Ранее было обнаружено, что избыток этого тиола стимулирует образование преимущественно парамагнитной моноядерной формы ДНКЖ с тиоловыми лигандами.

В инкубационной среде (при продувке образца азотом), содержащей митохондрии, S-нитрозоцистеин, железо и избыток цистеина наблюдалось образование ДНКЖ с цистеиновыми лигандами (рисунок 3.2.1.). О том, что в среде присутствуют именно Cys-ДНКЖ, можно судить по характерному для этих комплексов спектру ЭПР, который был аналогичен спектру ДНКЖ, зарегистрированному ранее в модельной системе без митохондрий. При смене газовой среды, которой продували образец, на кислород амплитуда сигнала ЭПР уменьшалась, что свидетельствует о снижении концентрации ДНКЖ в образце. Уже после 8-ми минутного воздействия кислорода на образец концентрация ДНКЖ снизилась в 5 раз относительно исходного уровня. Тем не менее, скорость разрушения ДНКЖ не изменилась в случае стимулированной антимицином А (блокатор комплекса III – комплекс цитохромов  $\text{bc}_1$  электрон-транспортной цепи) генерации  $\text{O}_2^{\bullet-}$  митохондриальным комплексом III (рисунок 3.2.1. б, кривая 2). Максимальная концентрация ДНКЖ, напротив, увеличилась.

Парадоксальным результатом этого исследования было значительно более быстрое снижение концентрации ДНКЖ в аэробных условиях после добавления СОД и каталазы (рисунок 3.2.1. б, кривая 3). Способность этих антиоксидантных ферментов защищать ДНКЖ от  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -индуцированной

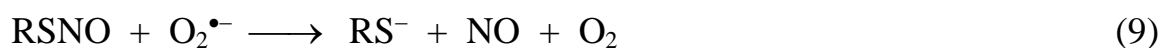


деградации была ранее продемонстрирована в исследованиях К.Б. Шумаева [Shumaev et al., 2008].



**Рисунок 3.2.1. Образование ДНКЖ в суспензиях изолированных митохондрий сердца крысы.** (а) Спектры ЭПР ДНКЖ с тиоловыми лигандами, зарегистрированные после 10 минут инкубации в анаэробных условиях (1) и через 8 минут после перехода в аэробные условия (2). (б) Кинетика образования ДНКЖ в инкубационной среде, содержащей митохондрии (~22 мг/мл белка), 10 мМ цистеина и 12 мМ Cys-NO в присутствии сукцината (1–3), антимицина А (2 и 3), 400 ед/мл СОД и 600 ед/мл каталазы (3). Переход от анаэробных к аэробным условиям обозначен стрелкой.

Принимая во внимание способность комплекса III высвобождать  $O_2^{\bullet-}$ , в матрикс и межмембранное пространство [Muller, 2004; Bleier, Droese, 2013], мы предположили, что этот эффект может быть связан с взаимодействием S-нитрозцистеина с  $O_2^{\bullet-}$ . Реакция  $O_2^{\bullet-}$  с RSNO, как правило, дает NO, тиол и молекулярный кислород [Trujillo, 1998]:



Другими возможными продуктами взаимодействия RSNO с  $O_2^{\bullet-}$  являются  $NO^-$  и  $OONO^-$ :

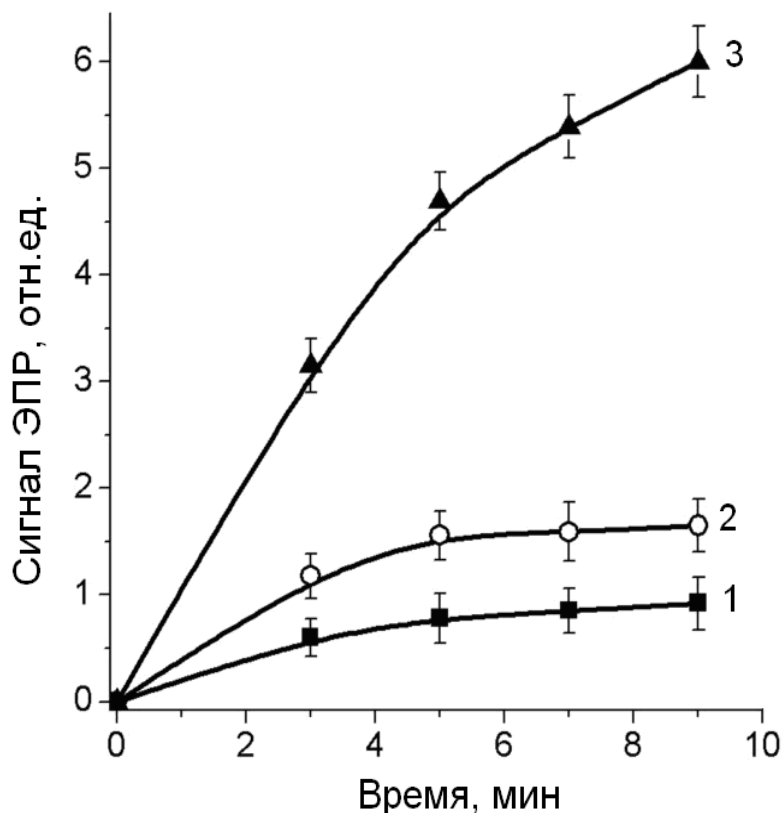


Тиоловые радикалы  $RS^{\bullet}$  и  $RSOO^{\bullet}$  также способны инициировать разложение RSNO до NO [Karoui, 1996]:



В дополнение к этим двум реакциям,  $RS^{\bullet}$  могут также генерироваться при взаимодействии  $OONO^-$  с восстановленным глутатионом (GSH). Образующийся  $GS^{\bullet}$  в реакции с молекулярным кислородом дает  $GSOO^{\bullet}$  [Rotta, 2003].

Характерной особенностью  $O_2^{\bullet-}$  является его способность выделять железо из аконитазы и ферритина [Biemond, 1988; Vasquez-Vivar, 2000]. Очевидно, что митохондриальные изоформы этих белков являются источниками двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ), необходимого для синтеза ДНКЖ. В наших исследованиях ферритин и GSNO, добавленные в реакционную среду, запускали синтез ДНКЖ; сигнал ЭПР возрастал, за счет  $O_2^{\bullet-}$ , генерируемого митохондриями (рисунок 3.2.2.). Возможно, что супероксид способствует синтезу ДНКЖ, высвобождая железо из белков переносчиков и увеличивая концентрацию NO в среде.



**Рисунок 3.2.2. Кинетика образования GS-ДНКЖ.**

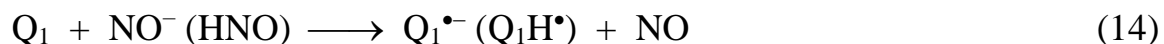
Реакционная среда содержала: (1) 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,4), 2 мМ GSH, 3 мМ GSNO и 0,2 мг/мл ферритин; (2) так же, как в (1) + митохондрии (5 мг белка/мл), 12 мМ сукцината; (3) то же, что и в (2) + 4 мкМ антимицина А.

### *Синтез ДНКЖ с участием нитроксила*

Еще одним аспектом влияния нитроксила на метаболизм нитрозильных комплексов железа может быть его участие в образовании ДНКЖ. Нельзя исключить, что депротонированная форма нитроксила (нитроксильный анион,  $\text{NO}^-$ ) может быть донором NO в организме и соответственно включаться в состав динитрозильных комплексов железа.

В серии экспериментов, моделирующих гипоксию, исследовалось образование цистеиновых ДНКЖ в среде, содержащей донор HNO соль Ангели, ионы двухвалентного железа и цистеин. Из данных, представленных на рисунке 3.2.3., видно, что при добавлении к реакционной среде коэнзима  $\text{Q}_1$  (водорастворимый аналог убихинона) выход тиоловых ДНКЖ существенно увеличивается, причём эффект хинона является количественным. Кроме того, в этих экспериментах с помощью спектроскопии ЭПР зарегистрировано появление семихинона  $\text{Q}_1$  (рисунок 3.2.3. б). Можно предположить, что при

взаимодействии коэнзима  $Q_1$  с  $NO^-$  происходит одноэлектронное окисление последнего в соответствии с реакцией:



Генерируемый в этой реакции свободный NO может включиться в состав ДНКЖ. В то же время, этот процесс ингибировался при аэрации (рисунок 3.2.3. б, кривая 2), что, по-видимому, связано с формированием пероксинитрита в реакции  $NO^-$  с молекулярным кислородом.

В биологических системах и используемых нами моделях HNO может также возникать в реакции между S-нитрозотиолами и тиолами [Shoman, 2016]:

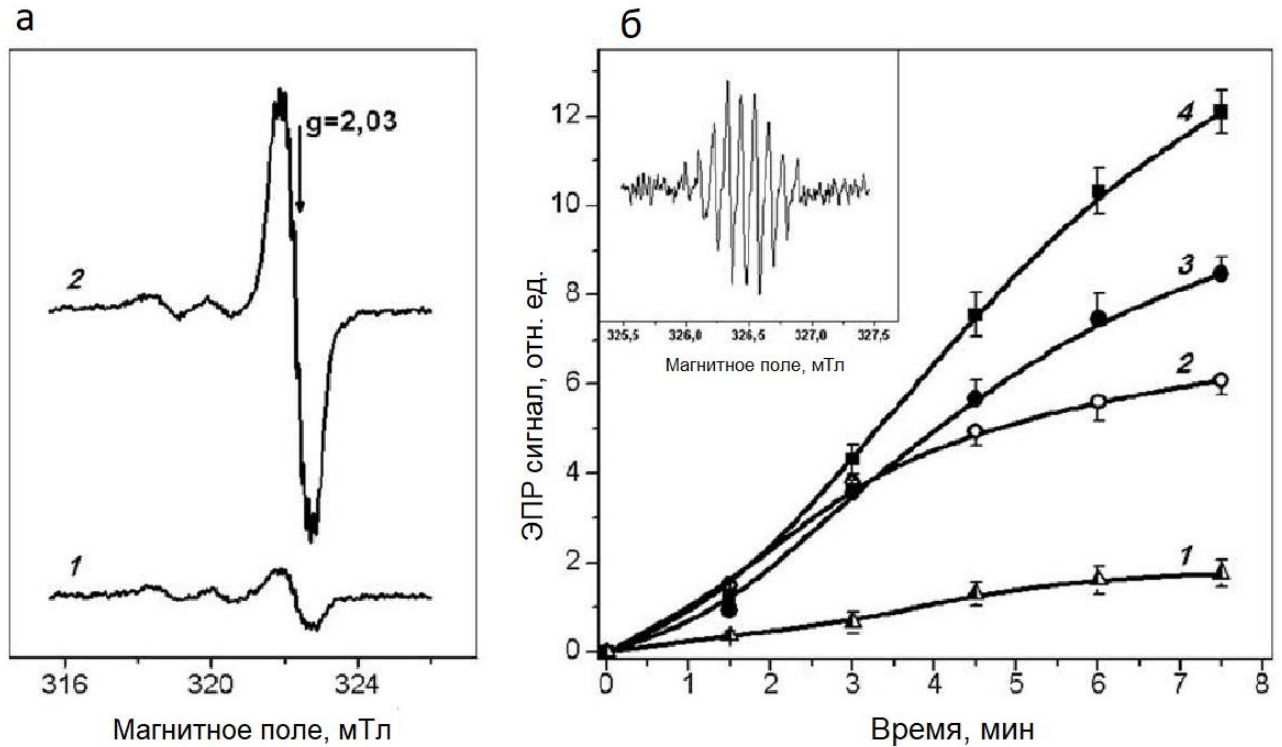


Таким образом, показано, что ДНКЖ действительно синтезируются в митохондриях. Причем формирование ДНКЖ связано с железосодержащими белками, модифицированными активными формами кислорода и азота. При этом необходимый для синтеза комплексов NO образуется в реакции S-нитрозотиолов с супероксидом или при одноэлектронном окислении нитроксила коферментом Q.

Генерация активных форм кислорода и азота в митохондриях находится в центре внимания исследователей на протяжении длительного периода времени. Основными неферментативными источниками АФК и свободных радикалов липидов являются реакции Фентона и Хабера-Вайса, катализируемые  $Fe^{2+}$ . Эти реакции лежат в основе патогенеза различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [Kruszewski, 2004; Zweier, Talukder, 2006; Gammella et al., 2015]. Ишемия и реперфузия миокарда обычно сопровождаются ацидозом и, как следствие, усиленной генерацией супероксидных радикалов и высвобождением трехвалентного или двухвалентного железа из металлопротеидов [Kruszewski, 2004]. Истощаемый при этом пул лабильного железа восполняется за счет взаимодействия  $H_2O_2$  и  $O_2^{\bullet-}$  с ферритином [Thomas et al., 1985; Biemond et al., 1988; Gammella et al.,

2015; Yoon 2010], Fe-S кластерами аконитазы и других Fe-S белков [Thomas et al., 1985; Zweier, Talukder, 2006].

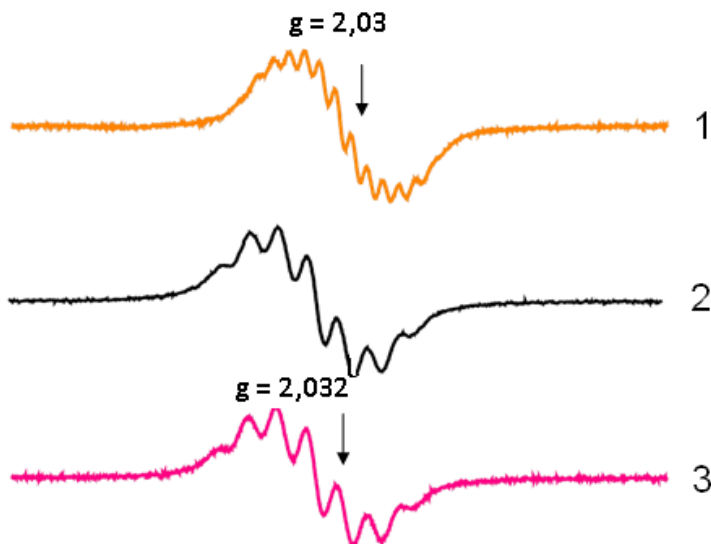
Полученные нами данные позволяют заключить, что в митохондриях ДНКЖ с тиоловыми лигандами и ферритин являются ключевыми элементами, регулирующими баланс активных форм кислорода.



**Рисунок 3.2.3. Формирование Cys-ДНКЖ с участием нитроксила.** Реакционная среда содержала 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ  $\text{FeSO}_4$ , 20 мМ цистеина, 5 мМ соли Ангели (донор  $\text{NO}^-/\text{HNO}$ ). **(а)** Спектры ЭПР Cys-ДНКЖ, зарегистрированные в реакционной среде в отсутствии (1) и в присутствии (2) коэнзима  $\text{Q}_1$ . Среда инкубировалась при продувке азотом 7,5 минут, концентрация коэнзима  $\text{Q}_1$  составляла 3,8 мМ. **(б)** Кинетика формирования ДНКЖ в реакционной среде без добавок (1), а также после добавления в неё коэнзима  $\text{Q}_1$  в концентрациях 1,6 мМ (кривые 2 и 3) и 3,8 мМ (кривая 4). Реакционная среда инкубировалась при продувке азотом (кривые 1, 3, 4) или воздухом (кривая 2). На вставке представлен спектр ЭПР семихинона коэнзима  $\text{Q}_1$ , который был зарегистрирован в условиях, моделирующих гипоксию.

### ***Взаимодействие нитроксила с тиоловыми лигандами ДНКЖ***

Баланс антиоксидантных и прооксидантных свойств NO во многом определяется образованием ДНКЖ [Шумаев с соавт., 2004; Shumaev et al., 2008]. Вместе с тем, нитроксил приводит к исчезновению сигнала ЭПР парамагнитной моноядерной формы тиолсодержащих ДНКЖ. Из представленных на рисунке 3.2.4. спектров видно, что добавление донора нитроксильного аниона соли Ангели к цистеиновым ДНКЖ (HNO : цистеиновые лиганды – 2 : 1) приводит к исчезновению сверхтонкой структуры спектра ЭПР, характерной для тиоловых ДНКЖ, и возникновению сверхтонкой структуры, характерной для фосфатных ДНКЖ.



**Рисунок 3.2.4. Влияние донора нитроксила – соли Ангели на цистеиновые ДНКЖ.** Состав реакционной смеси: (1) 1 мМ цистеиновых ДНКЖ в 100 мМ фосфатном буфере; (2) то же, что (1) + 4 мМ соли Ангели; (3) 1 мМ ДНКЖ-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

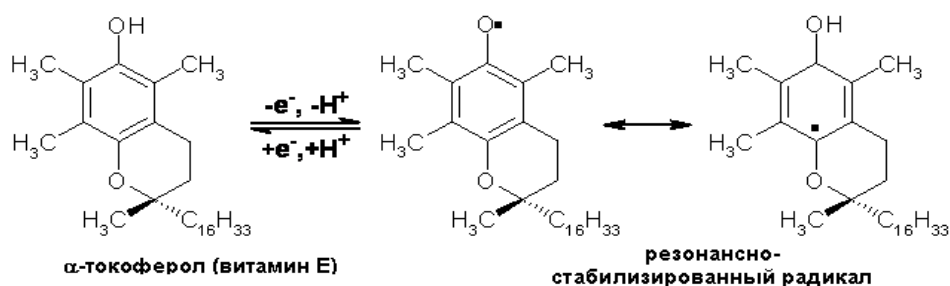
Этот факт указывает на то, что цистеин в нитрозильном комплексе замещается на фосфатные лиганды буфера. Это согласуется с известными из литературы данными о том, что нитроксил взаимодействует с тиоловыми группами с образованием *N*-гидроксисульфенамида и далее сульфенамида. Исчезновение свободных SH-групп под действием нитроксила также было показано в экспериментах с флуоресцентной меткой ThioGlo-1 (рисунок 3.1.5.).

### **3.2.2. Взаимодействие нитроксила с токоферолом**

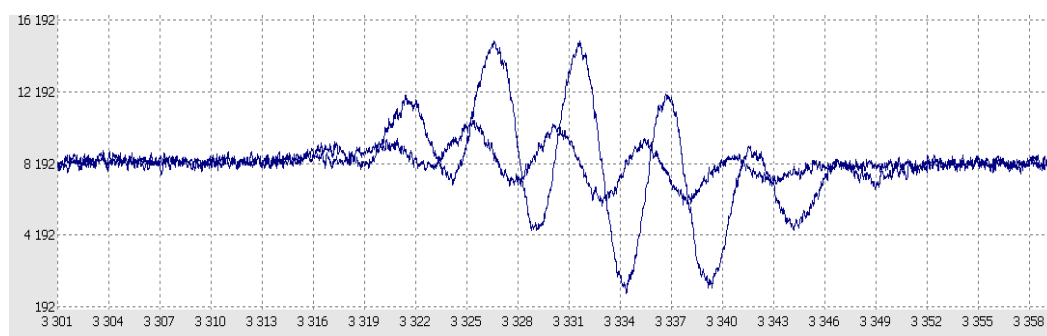
В организме убихинон, взаимодействуя с нитроксидом, превращается в убисемихинон и далее участвует в переносе электронов в дыхательной цепи

митохондрий. Интересно, что в живых системах восстановленная форма убихинона (CoQ) – убихинол является антиоксидантом, восстанавливающим радикальную форму (токофероксильный радикал) другого антиоксиданта – токоферола. Регенерация ключевого гидрофобного антиоксиданта токоферола является важнейшим механизмом, предотвращающим свободнорадикальное окисление липидов [Бурлакова с соавт., 1998; Varouh et al, 2021]. В 2007 году в работе López была высказана гипотеза о том, что, исходя из того, что нитроксил имеет величину редокс потенциала равную – 0,8 В, он должен быть хорошим восстановителем для токоферола или убихинона [López et al, 2007].

В наших экспериментах было впервые показано, что нитроксил, действительно, способен восстанавливать свободный радикал токоферола. Токофероксильный радикал получали путем окисления раствора токоферола  $MnO_2$ . Поскольку токофероксильный радикал является резонансно-стабилизированным (рисунки 3.2.5. и 3.2.6.), его концентрация остается постоянной в течение десятков минут, что делает удобным изучение этого радикала методом ЭПР.

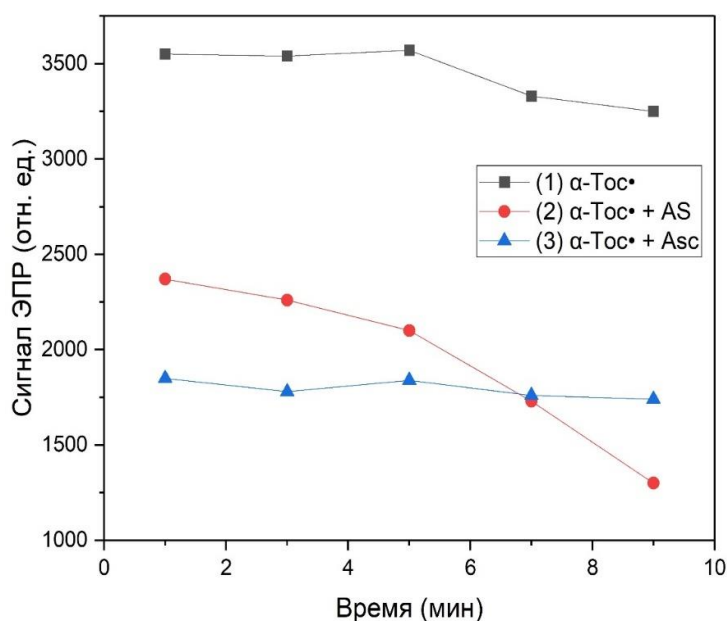


**Рисунок 3.2.5. Токоферол и токофероксильный радикал.**



**Рисунок 3.2.6. Падение величины сигнала ЭПР токофероксильного радикала после добавления донора нитроксильного аниона.**

Как видно из представленных на рисунках 3.2.6. и 3.2.7. данных добавление нитроксильного аниона приводило к заметному уменьшению величины сигнала ЭПР токофероксильного радикала. Также значительно увеличивалась скорость падения сигнала токофероксильного радикала, причем значительное изменение концентрации токофероксильного радикала происходило в течение первых минут (рисунок 3.2.7.). Суммарный эффект от добавления нитроксила и аскорбиновой кислоты превосходил эффект нитроксила в отдельности. Аскорбиновая кислота использовалась в качестве стандартного гидрофильного антиоксиданта, восстанавливающего радикал токоферола в живых системах.



**Рисунок 3.2.7. Сигнал токофероксильного радикала и его изменение при добавлении нитроксила или аскорбата.** Состав реакционной смеси: (1) 70 мМ α-Тос; (2) = (1) + соль Ангели; (3) = (1) + аскорбиновая кислота. Во всех случаях использовался 25 мМ фосфатный буфер (рН 7,8).

Как следует из представленных выше данных нитроксильный анион восстанавливает токофероксильный радикал до не детектируемой ЭПР формы (восстановленного токоферола). По аналогии с убихинолом и аскорбатом взаимодействие радикальной формы витамина Е с нитроксилом, вероятно, происходит в соответствии со следующей реакцией:



Таким образом, в наших экспериментах было впервые показано, что нитроксила способен восстанавливать свободный радикал токоферола.



Можно предположить, что нитроксил является важным регулятором антиоксидантных и прооксидантных процессов в живых организмах. В том числе он может участвовать в образовании и модификации ДНКЖ и реагировать с радикальными формами таких антиоксидантов как CoQ и токоферол.

### **3.3. Антиоксидантное и антигликирующее действие нитроксила**

#### **3.3.1. Влияние нитроксила на модификацию гемоглобина гликированием и окислением**

Образование конечных продуктов гликирования часто сопряжено с окислительным стрессом [Шумаев с соавт., 2009; Baynes, 1991; Yim et al., 1995; Kalapos, 2008; Goodarzi et al., 2014; Kosmachevskaya et al., 2014]. С одной стороны, в реакции с участием метилглиоксаля образуются свободнорадикальные интермедиаты, включая АФК. С другой стороны, сами АФК продуцируют новые порции КППГ.

Для того, чтобы снизить пагубные последствия гипергликемии применяют ингибиторы КППГ. Идеальный ингибитор сочетает свойства «ловушки» активных карбонильных соединений, антиоксиданта и хелатора редокс-активных ионов металлов (меди и железа), которые катализируют автоокисление глюкозы.

Молекула нитроксила обладает совокупностью свойств, которые позволяют рассматривать ее в качестве перспективного ингибитора КППГ или антигликирующего вещества. Благодаря сильным электрофильным свойствам  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  легко реагирует с нуклеофильными группами белков (например, с белковыми SH-группами), блокируя их [Suarez et al., 2015; Smulik-Izydorczyk et al., 2021]. Также, являясь хорошим донором электрона и протона, нитроксил может действовать как классический антиоксидант [Lopez et al., 2007]. Кроме того, этот метаболит NO может участвовать в формировании ДНКЖ, тем самым снижая его токсическое действие в условиях окислительного стресса [Shumaev et al., 2017, 2018]. Антигликирующее действие нитроксила может

быть связано с NO, который, как было показано в работе [Asahi et al., 2000], замедляет образование флуоресцирующих КПП.

Принимая во внимание эти факты и то, что к настоящему времени в литературе отсутствуют данные о влиянии нитроксила на гликирование белков метилглиоксалем, была поставлена задача изучить влияние нитроксила на модификацию гемоглобина окислением и гликированием. Гемоглобин эритроцитов был выбран в качестве объекта изучения поскольку он в большой степени подвержен неферментативному гликированию. Время жизни этого белка достаточно велико для того, чтобы произошла реакция с глюкозой или метилглиоксалем [Kosmachevskaya et al., 2021].

### ***Влияние нитроксила на неферментативное гликирование гемоглобина***

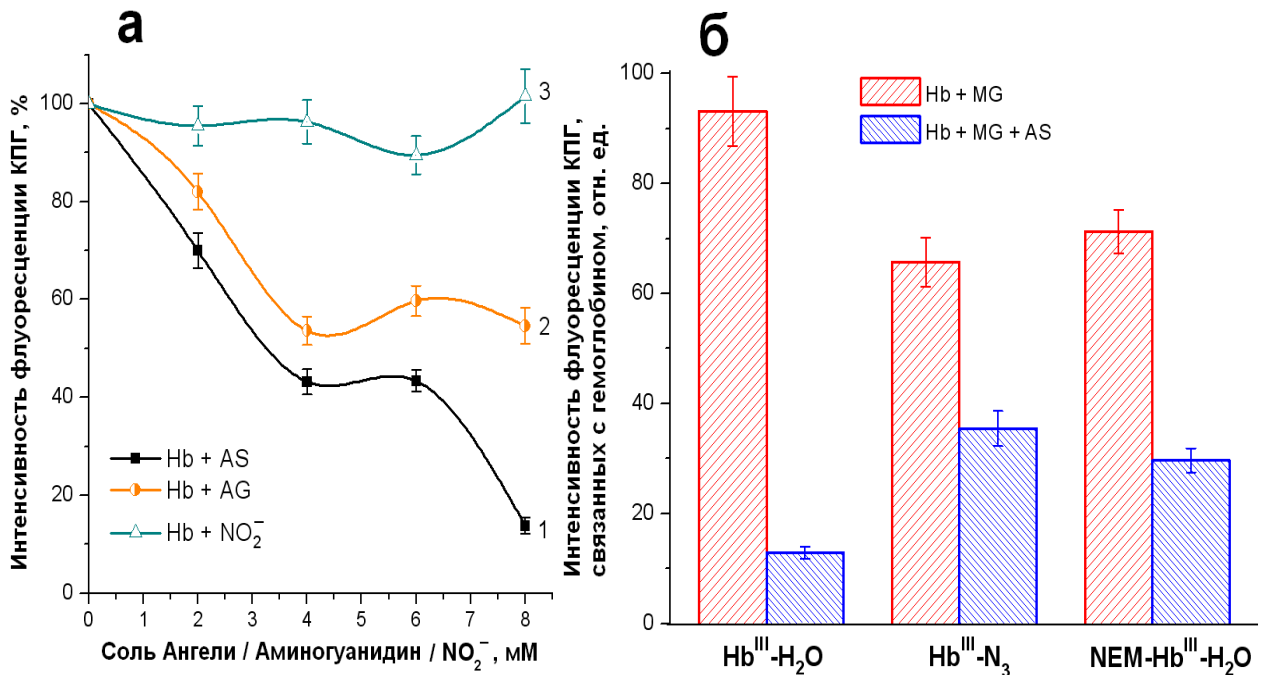
Антигликирующее действие нитроксила исследовали в экспериментальной системе, моделирующей карбонильный стресс. В качестве объекта исследования был взят эритроцитарный гемоглобин. В качестве гликирующего вещества использовали MG, высокие уровни которого обнаруживаются в эритроцитах в условиях диабетической гипергликемии [Kong et al., 2014; Kosmachevskaya et al., 2021]. Донором нитроксила выступала соль Ангели [DuMond, King, 2011], которую в настоящее время часто используют в фармакологических исследованиях [Switzer et al., 2009]. Соль Ангели быстро разлагается ( $t_{1/2} = 3$  мин) при физиологических pH и температуре с образованием HNO и NaNO<sub>2</sub> [Miranda et al., 2005; Switzer et al., 2009]. Следует отметить, что нитроксил имеет pKa = 11,4, поэтому при физиологическом pH он будет присутствовать преимущественно в протонированной форме [Shafirovich et al., 2002]. Антигликирующую активность нитроксила сравнивали с аминоксидом, который является эффективной ловушкой КПП [Thornalley et al., 2000]. Аминоксид выступал в качестве стандартного антигликирующего соединения (положительный контроль).

Гемоглобин инкубировали с высокой концентрацией MG (молярное соотношение 1 : 90 в расчете на субъединицы Hb) при 37 °C в течение суток. И донор нитроксила и амингуанидин дозозависимо ингибировали образование флуоресцирующих КПГ (рисунок 3.3.1. а, кривые 1 и 3). Причем ингибирующее действие соли Ангели было более выражено, чем амингуанидина. Поскольку известно, что при разложении соли Ангели образуется один моль HNO и один моль NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, было исследовано действие тех же концентраций NO<sub>2</sub><sup>-</sup> на образование КПГ (рисунок 3.3.1. а, кривая 2). Ионы нитрита не влияли на процесс гликирования гемоглобина MG, что свидетельствует о том, что наблюдаемый антигликирующий эффект соли Ангели обусловлен действием именно HNO.

Антигликирующее действие амингуанидина во многом обусловлено его сильными нуклеофильными свойствами, благодаря которым он образует аддукты с α-дикарбонильными соединениями, такими как метилглиоксаль, глиоксаль, 3-дезоксиглюкозон, тем самым блокируя превращение продуктов Амадори в КПГ [Song et al., 2021]. Кроме этого, амингуанидин может действовать как антиоксидант и хелатирующий агент, подавляя образование гидроксильных радикалов и перекисное окисление липидов в клетках и тканях [Giardino et al., 1998; Thornalley et al., 2000].

Можно предположить, что антигликирующее действие нитроксила обусловлено его антиоксидантными свойствами. Также нельзя исключить влияние HNO на тиолы и гемовую группу гемоглобина [Shoman, Aly, 2016; Smulik-Izydorczyk et al., 2021]. Поэтому аналогичное исследование было проведено с Hb-N<sub>3</sub> и NEM-Hb. Формирование гемового комплекса с N<sub>3</sub> ингибировало образование КПГ на 30%, а блокировка реакционноспособных SH-групп (βCys93) с помощью NEM – на 24 % (рисунок 3.3.1. б). Этот факт свидетельствует об участии доступного гемового железа и SH-групп в процессах модификации белка в реакциях с метилглиоксалем. В обоих

вариантах Hb антигликирующее действие соли Ангели было менее выражено по сравнению с Hb, немодифицированным NaN<sub>3</sub> и NEM.



**Рисунок 3.3.1. Образование флуоресцирующих конечных продуктов гликирования в реакции гемоглобина с метилглиоксалем. (а)** – Влияние различных концентраций соли Ангели (AS) – 1, аминогуанидина (AG) – 2, и ионов нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – 3. Данные представлены в % от уровня КПГ, образованных в контрольном образце. **(б)** – Влияние NaN<sub>3</sub> и NEM, а также соли Ангели (8 мМ). Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), 54 мМ MG. Смесь инкубировали в течение 24 часов при 37°С.

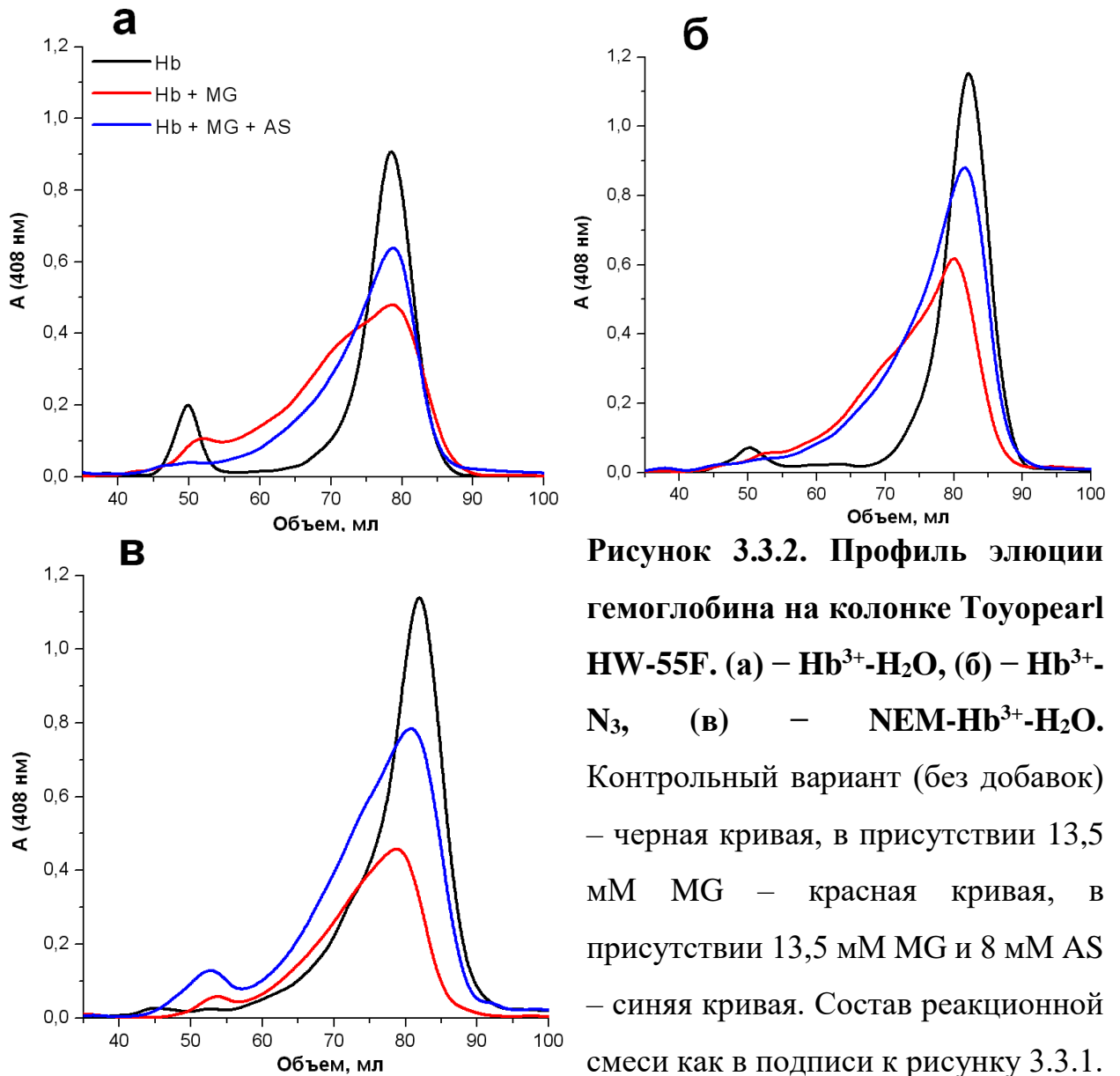
В литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования [Bucala et al., 1991; Asahi et al., 2000]. В то же время в работе [Asahi et al., 2000] показано, что различные доноры NO ингибируют образование пентозидинов. Это обусловлено способностью NO перехватывать свободные радикалы, возникающие в реакциях неферментативного гликирования [Lee et al., 1998; Шумаев с соавт., 2009].

Поскольку в ходе реакций неферментативного гликирования образуются КПГ, формирующие межбелковые сшивки, мы исследовали влияние донора нитроксила на образование поперечно-сшитых форм Hb с

помощью гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации), которая позволяет разделять белки по размеру молекул. Разделение проводили в хроматографической колонке с носителем Toyppearl HW-55F. Профиль элюции интактного гемоглобина имел два выраженных пика при 50 мл и 82 мл (рисунок 3.3.2., черная кривая), которые соответствуют димерной и мономерной формам Hb. Причем, пик 1 (50 мл) представлял собой незначительную фракцию. В случае Hb-N<sub>3</sub> и NEM-Hb она была еще менее выражена, по сравнению с Hb. Этот факт можно объяснить влиянием доступных гемовой группы и SH-групп на автоокислительные процессы.

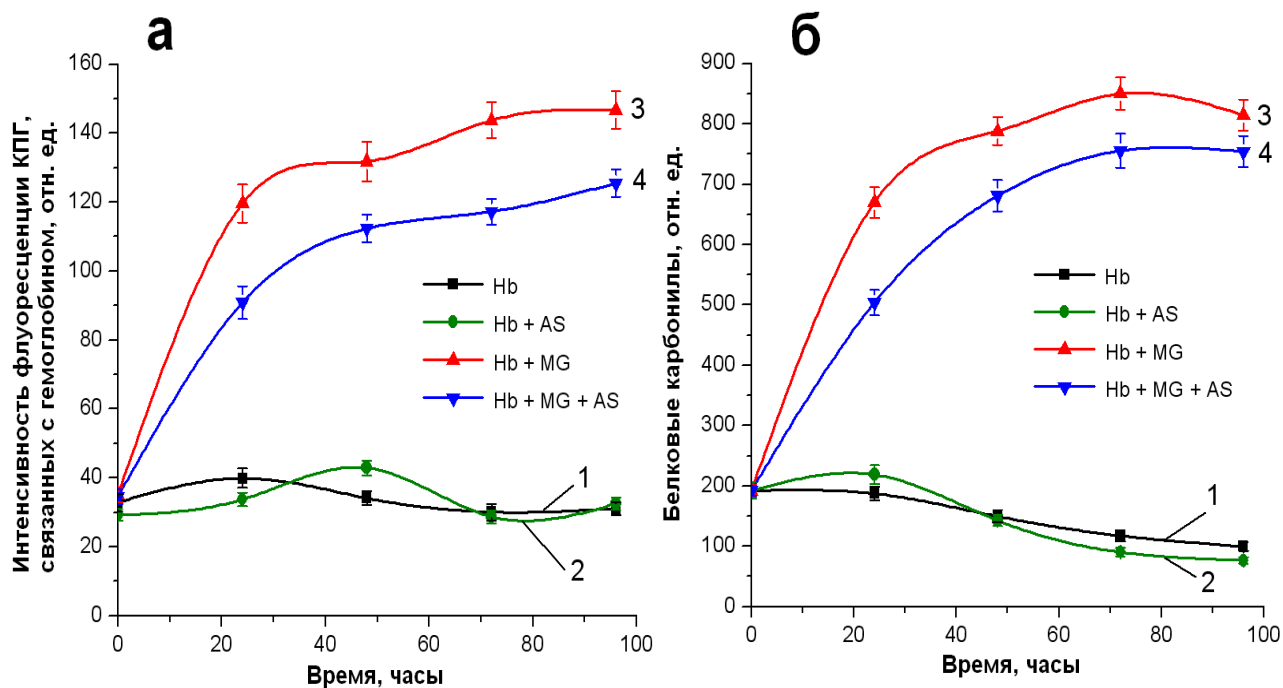
Гель-фильтрационному разделению также подвергались образцы Hb, инкубируемые предварительно с MG или MG и солью Ангели (8 мМ) в течение 24 часов. Во всех случаях инкубация с MG приводила к уменьшению фракции мономера и увеличению фракций, локализованных между первым и вторым пиками (рисунок 3.3.2., красная кривая). Также модификация MG приводила к формированию крупных белковых агрегатов, которые не проникали в колонку, оседая в поверхностном слое носителя. В случае Hb-N<sub>3</sub> такие агрегаты составляли 15%, а в случае NEM-Hb около 60%. Эти данные показывают, что происходит интенсивная модификация молекул Hb продуктами гликирования, сопровождающаяся формированием межсубъединичных сшивок.

Нитроксил оказывал защитное действие на гемоглобин не зависимо от формы белка (рисунок 3.3.2., синяя кривая). При этом он снижал не только количество КППГ, связанных с Hb, но и количество сшитых (мультимерных) молекул Hb. В присутствии соли Ангели олигомеризация Hb практически не происходила.



**Рисунок 3.3.2. Профиль элюции гемоглобина на колонке Toyopearl HW-55F. (а) –  $\text{Hb}^{3+}\text{-H}_2\text{O}$ , (б) –  $\text{Hb}^{3+}\text{-N}_3$ , (в) –  $\text{NEM-Hb}^{3+}\text{-H}_2\text{O}$ . Контрольный вариант (без добавок) – черная кривая, в присутствии 13,5 мМ MG – красная кривая, в присутствии 13,5 мМ MG и 8 мМ AS – синяя кривая. Состав реакционной смеси как в подписи к рисунку 3.3.1.**

На следующем этапе мы изучали действие соли Ангели на модификацию гемоглобина метилглиоксалем во времени. Для этой серии экспериментов была выбрана концентрация донора нитроксила 3,2 мМ, соответствующая концентрации полуингибирующая ( $\text{IC}_{50}$ ). Добавка соли Ангели к реакционной смеси, содержащей  $\text{metHb}$ , снижала уровень флуоресцирующих КПП и белковых карбониллов приблизительно на 30% через 24 часа (рисунок 3.3.3.). Причем ингибирующий эффект сохранялся в течение всего времени инкубации (96 ч).

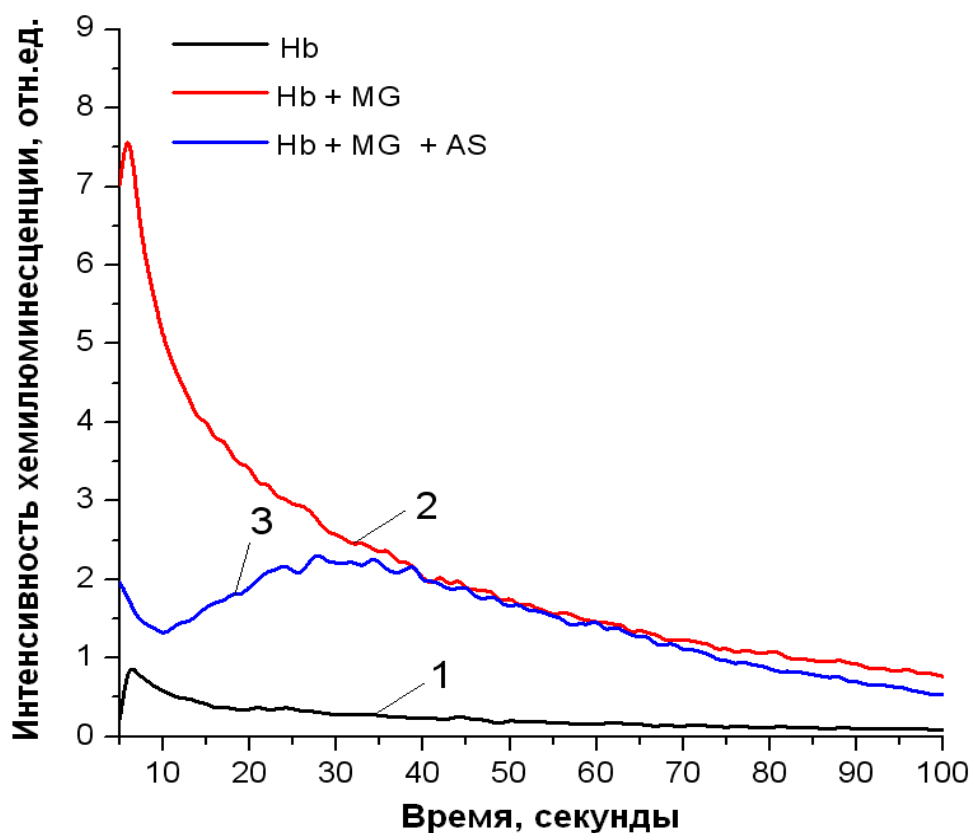


**Рисунок 3.3.3. Влияние нитроксила на образование флуоресцирующих КПГ (а) и карбонильных групп (б) в реакции гемоглобина с метилглиоксалем.** 1 – контрольный вариант (без добавок), 2 – с добавкой соли Ангели, 3 – с добавкой метилглиоксаля, 4 – с добавкой соли Ангели и метилглиоксаля. Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb гемоглобина в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), 54 мМ MG, 3,2 мМ соли Ангели.

### *Влияние нитроксила на образование свободнорадикальных продуктов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем*

Как известно, реакции аминокислот или белков с MG сопровождаются продукцией свободных радикалов и активных форм кислорода (анион-радикала метилглиоксаля, катион радикала диалкилимина (основания Шиффа), супероксидного анион-радикала) [Шумаев с соавт., 2009; Lee et al., 1998]. С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции мы оценили уровень свободнорадикальных интермедиатов в реакционной системе, содержащей metHb, который в течение 24 часов инкубировали с 13,5 мМ MG, а также с 13,5 мМ MG и 8 мМ соли Ангели. Хемилюминесценцию в реакционной смеси индуцировали добавлением люминола. На рисунке 3.3.4. представлены кривые, зарегистрированные спустя 2-3 секунды после внесения

люминола. Видно, что донор нитроксила существенно снижает количество свободнорадикальных продуктов реакции.



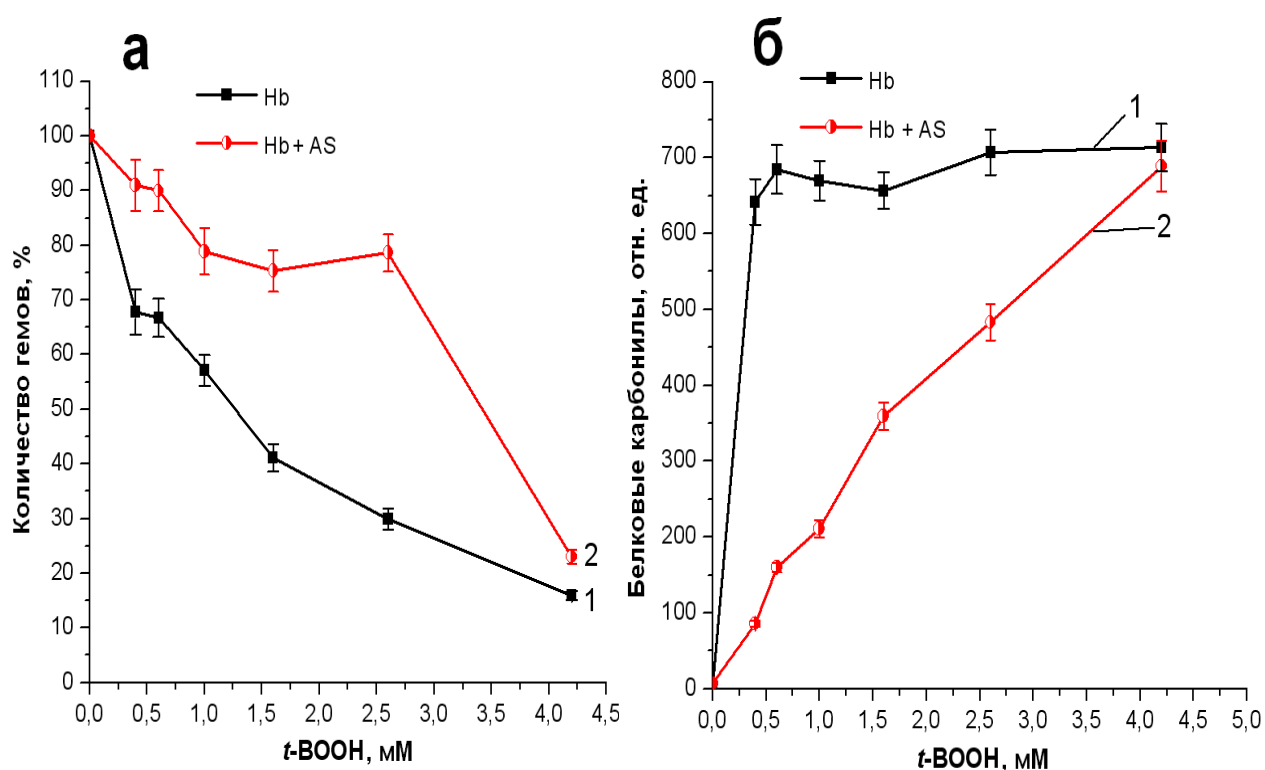
**Рисунок 3.3.4.** Влияние соли Ангели на образование свободнорадикальных продуктов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем. Контрольный вариант (без добавок) – черная кривая (1), в присутствии метилглиоксаля – красная кривая (2), в присутствии метилглиоксаля (13,5 мМ) и соли Ангели (8 мМ) – синяя кривая (3). Перед измерением добавляли люминол до конечной концентрации 2 мМ.

***Влияние нитроксила на окислительную модификацию гемоглобина в реакции с гидропероксидом трет-бутила***

Известно, что гликирование гемоглобина глюкозой, фруктозой и метилглиоксалем приводит к деградации гемовой группы из-за образования эндогенных активных форм кислорода [Nagababu et al., 2004; Goodarzi et al., 2014]. Поэтому было исследовано влияние соли Ангели на окислительную модификацию гемоглобина в реакции с *t*-BOOH.

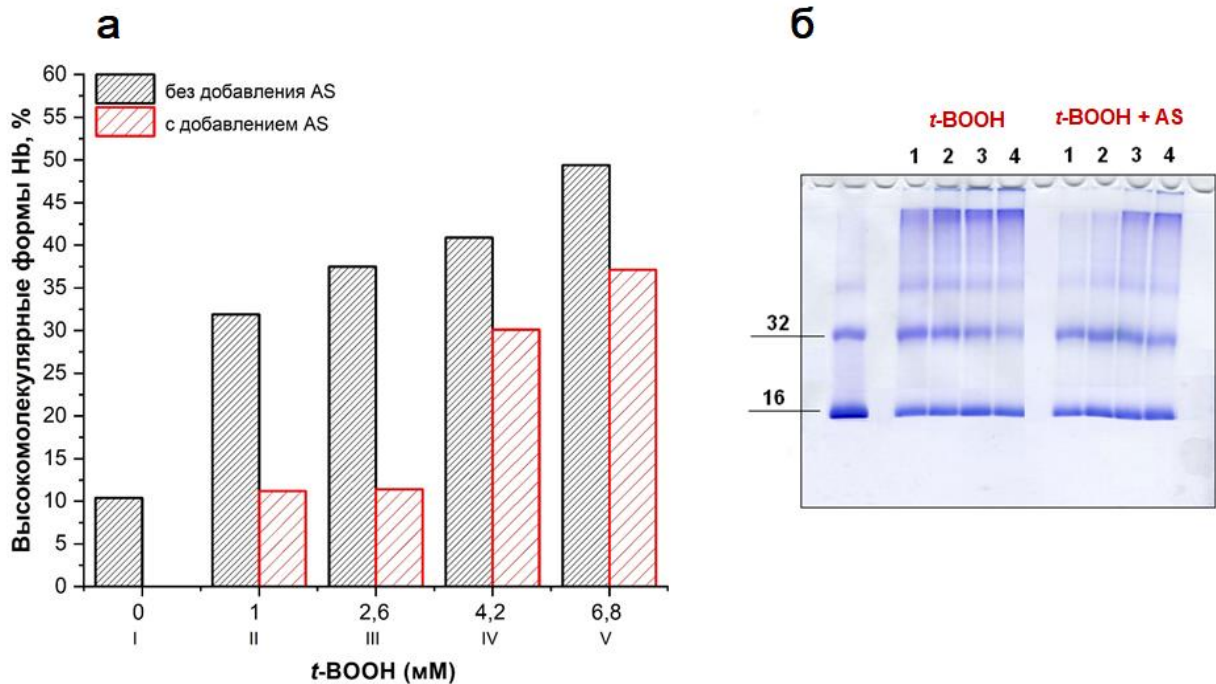


Под действием различных концентраций *t*-BOOH происходило разрушение гемовой группы metHb (рисунок 3.3.5. а, черная кривая). Добавление в реакционную смесь соли Ангели оказывало значительный защитный эффект на гем (рисунок 3.3.5. а, красная кривая). Кроме этого, в данной экспериментальной системе донор нитроксила препятствовал образованию новых карбонильных групп белка (рисунок 3.3.5. б, красная кривая), возникающих вследствие окислительного повреждения аминокислотных остатков Hb. Особенно выражен защитный эффект донора нитроксила при низких концентрациях *t*-BOOH.



**Рисунок 3.3.5. Влияние соли Ангели на разрушение гемовой группы (а) и образование карбонильных групп (б) гемоглобина под действием различных концентраций гидропероксида *трет*-бутила. В (а) за 100% принято количество гемов в контрольном образце. Контрольный образец – 1, соль Ангели – 2. Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Концентрация соли Ангели 2 мМ.**

Это также подтверждают данные SDS-электрофореза в 12% ПААГ (рисунок 3.3.6). По мере увеличения концентрации гидроперекиси происходило увеличение высокомолекулярных форм Hb. В случае высоких концентраций *t*-BOOH (4,2 и 6,8 мМ) агрегаты белка были настолько велики, что даже не проникали в концентрирующий гель. При этом происходила деградация белка, о чем свидетельствует снижение интенсивности полосы димерной формы Hb (рисунок 3.3.6. б, треки 3 и 4).

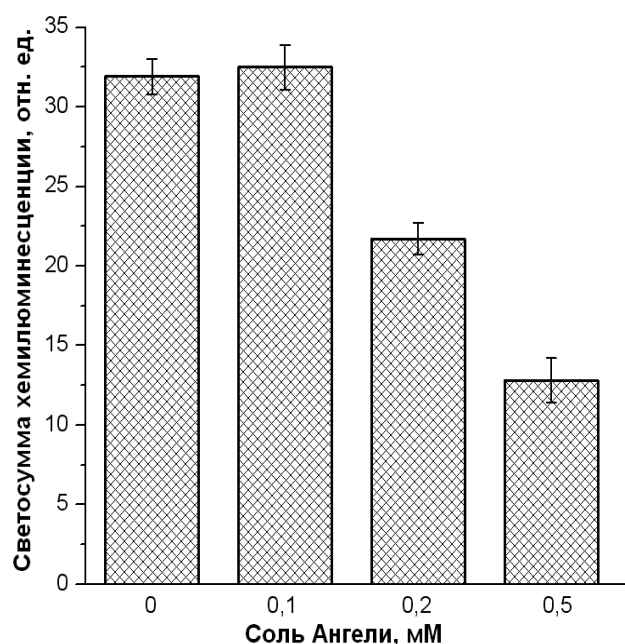


**Рисунок 3.3.6. Влияние донора нитроксила – соли Ангели на агрегацию гемоглобина под действием гидропероксида *трет*-бутила. (а) Образование высокомолекулярных форм гемоглобина. Представлены данные электрофореза, полученные при обработке изображения с использованием программы Image Lab Software – Bio-Rad. За 100 % принято содержание белка в контрольном варианте. (б) Электрофорез в 12% SDS/ПААГ. Концентрация соли Ангели 2 мМ. Цифрами обозначены концентрации *t*-BOOH: 1 – 1 мМ, 2 – 2,6 мМ, 3 – 4,2 мМ, 4 – 6,8 мМ. Крайняя левая полоса гемоглобин контрольный вариант (без добавок), который представлен преимущественно мономерной (16 кДа) и димерной (32 кДа) формами.**

**Влияние нитроксила на продукцию свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с гидропероксидом трет-бутила**

Свободные радикалы, образующиеся в ходе реакции MG с аминокислотными остатками белка, могут быть источником  $H_2O_2$  и органических гидропероксидов (в частности гидропероксидов липидов и белков). Реакции гемоглобина с органическими гидропероксидами достаточно хорошо изучены и, как правило, сопровождаются образованием свободных радикалов органической гидроперекиси и белка.

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции metHb с *t*-BOOH регистрировали с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. Соль Ангели дозозависимо снижала выход свободных радикалов (рисунок 3.3.7.). В концентрации 0,2 мМ в реакционной среде, нитроксил снижал интенсивность хемилюминесценции на 30%.



**Рисунок 3.3.7. Влияние соли Ангели на образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с гидропероксидом трет-бутила.** Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), 2 мМ люминола, 0,6 мМ *t*-BOOH.

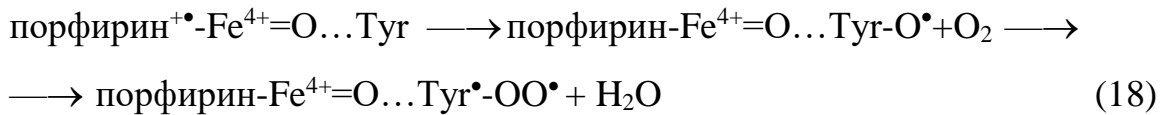
Взаимодействие metHb с гидроперекисями приводит к двухэлектронному окислению белка с образованием оксоферрильного интермедиата с катион радикалом на порфириновом кольце (порфирин<sup>+•</sup>-Fe<sup>4+</sup>=O), [Svistunenko, 2005; Reeder, 2017]. Этот радикал мигрирует на аминокислоту (тирозин, триптофан, гистидин, цистеин), расположенную

вблизи гемового кармана [Svistunenکو, 2005; Reeder, 2017]. Чаще всего свободный радикал локализуется на остатке тирозина [Svistunenکو et al., 2002].

При высокой концентрации органические гидроперекиси могут выступать в роли восстановителей оксоферрильной формы Hb, что сопровождается образованием пероксильных радикалов:



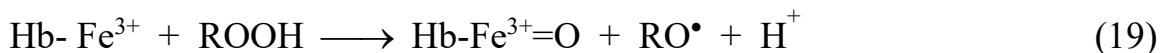
Пероксильные радикалы могут образовываться и на аминокислотных остатках самого белка, чаще всего на остатках триптофана, тирозина и цистеина, когда молекулярный кислород реагирует с радикалом [Svistunenکو, 2005]:

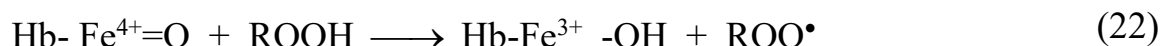
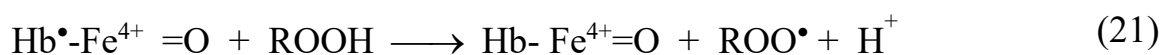


В результате межмолекулярного переноса электронов от радикалов аминокислот могут возникать межмолекулярные и внутримолекулярные сшивки, сопровождающиеся образованием белковых олигомеров или сшивкой гема и белковой части.

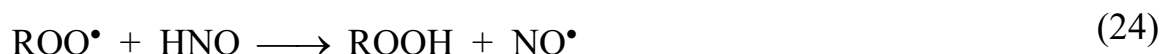
Феррил-форма Hb и связанный с белком радикал индуцируют реакции свободнорадикального окисления липидов мембран, в результате которых образуются алкоксильные (RO<sup>•</sup>) и алкилпероксильные (ROO<sup>•</sup>) радикалы и гидроперекиси липидов (ROOH) [Svistunenکو, 2005; Reeder, 2017]. Под действием этих свободнорадикальных продуктов происходит окислительная модификация гемоглобина, приводящая к деградации гема и высвобождению ионов железа, катализирующих образование свободных радикалов в реакциях Фентона и Хабера-Вайса [Reeder et al., 2004].

Итак, реакция metHb с органической гидроперекисью приводит к образованию оксоферрилHb с радикалом на порфирине или на белковой части, а также алкоксильных и алкилпероксильных радикалов гидроперекиси (реакции 19-22) [Kanner, Harel, 1985; Vlasova et al., 2018]:





Нитроксил может нейтрализовать перекисные радикалы за счет того, что является хорошим донором атома водорода [Lopez et al., 2007; Switzer et al., 2009]:



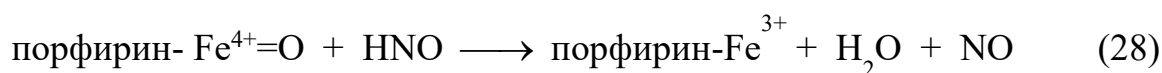
Кроме того, оксид азота (NO), образуемый в ходе окисления HNO, как известно, тоже может купировать развитие реакций свободнорадикального окисления липидов, взаимодействуя с радикалами гидроперекисей [Hogg et al., 1993; Hogg, Kalyanaraman, 1999; Gudkov et al., 2007]. NO может активно реагировать с ROO $\cdot$  и RO $\cdot$  с константой скорости реакции  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Показано, что радикально-радикальная реакция между оксидом азота и органическими пероксильными радикалами ограничена диффузией и приводит к образованию интермедиата ROONO (реакция 25):



Далее у ROONO может быть два пути: 1) внутримолекулярная перегруппировка с образованием более стабильного RONO $_2$  (реакция 26) и 2) гомолитический разрыв связи O–O с образованием RO $\cdot$  и NO $_2\cdot$ . Алкоксильный радикал может реагировать с NO $\cdot$  (реакция 27), что останавливает дальнейшее развитие реакций ПОЛ.



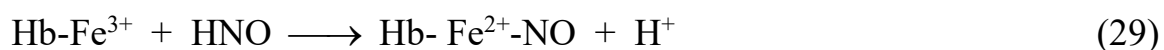
Не исключено, что HNO может восстанавливать оксоферрильный интермедиат:



Эта способность нитроксила была подтверждена в экспериментах по восстановлению  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$ , который был получен добавлением небольшого избытка  $\text{H}_2\text{O}_2$  к белку. Непрореагировавшую перекись удаляли каталазой. Добавка соли Ангели в эквимольном количестве приводила к практически полному восстановлению  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$  до  $\text{metHb}$  через одну минуту, о чем свидетельствовало снижение поглощения при 541 и 582 нм и увеличение при 631 нм, характерного для окисленной формы Hb (рисунок 3.3.8. а). Соль Ангели также замедляла образование  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$  в системе окисления гемоглобина гидропероксидом *трет*-бутила (рисунок 3.3.8. б).

Генерацию органических свободных радикалов, образуемых в реакции  $\text{metHb}$  с гидропероксидом *трет*-бутила, регистрировали с помощью спектроскопии ЭПР со спиновой ловушкой DEPMPO (рисунок 3.3.9. б, спектр 1).

Нитроксил с окисленным железом гема вступает в реакцию восстановительного нитрозилирования (для  $\text{metMb}$   $k = 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) с образованием нитрозилHb ( $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-NO}$ ) [Bari et al., 2003]:



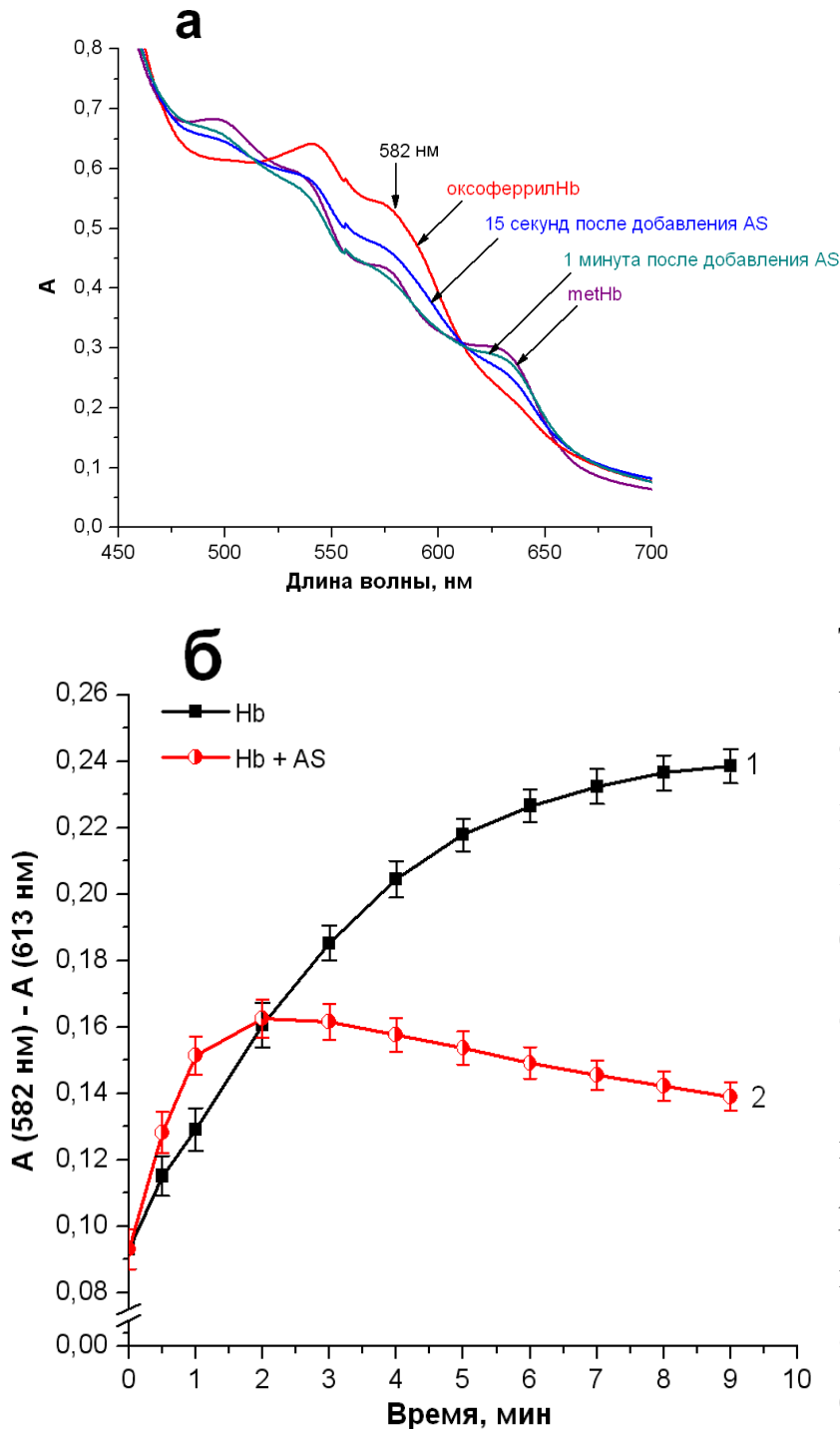
Образование нитрозилгемоглобина было зарегистрировано при добавлении соли Ангели к  $\text{metHb}$  (рисунок 3.3.9. а). Вместе с тем, нитрозилирование гемоглобина под действием HNO практически полностью ингибировало образование свободных радикалов (рисунок 3.3.9. б, спектр 2).

Можно предположить, что  $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-NO}$  восстанавливает *t*-BOOH с образованием нитрита и метгемоглобина (реакция 30):



В работе [Gorbunov et al., 1995; Baron et al., 2007] такой механизм был предложен для взаимодействия метмиоглобина и *t*-BOOH.

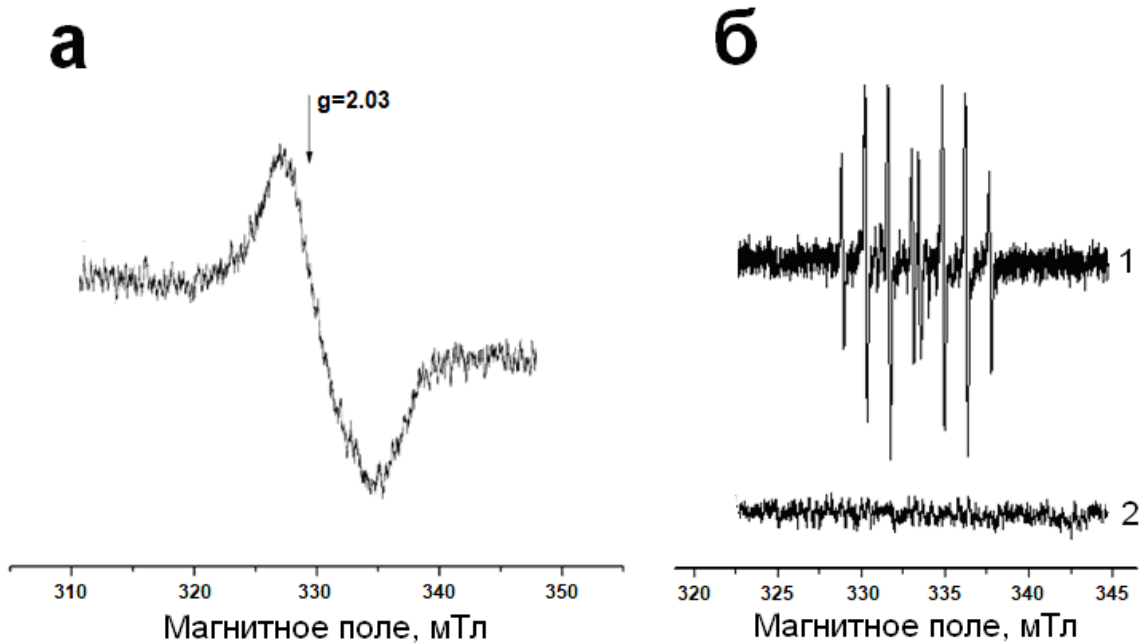
Таким образом, антиоксидантное действие нитроксильного аниона в исследуемой реакционной системе также может быть обусловлено реакциями 29 и 30.



**Рисунок 3.3.8. Влияние донора нитроксила – соли Ангели на образование оксоферрилHb в реакции гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила.**

**(а)** Восстановление оксоферрилHb нитроксилом. Состав реакционной смеси: 0,03 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), 0,4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,12 мМ соли

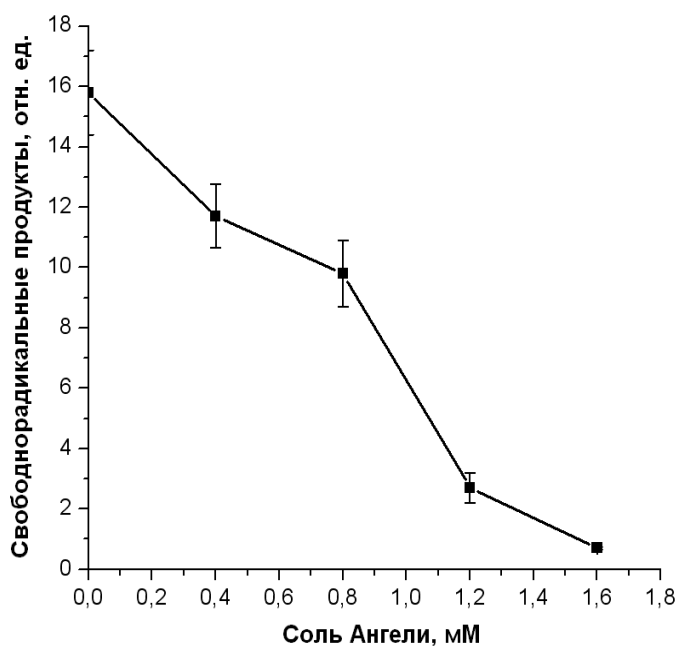
Ангели. Для удаления непрореагировавшей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли каталазу (0,456 единиц). **(б)** Влияние нитроксила на кинетику образования оксоферрилHb. 1 – контрольный вариант (без добавок), 2 – с добавкой соли Ангели. Состав реакционной смеси: 0,03 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), 0,71 мМ *t*-BOOH. Соль Ангели вносили одновременно с *t*-BOOH в концентрации 0,4 мМ.



**Рисунок 3.3.9.** Антиоксидантное действие донора нитроксила – соли Ангели в условиях генерации свободных радикалов в реакции гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила. (а) спектр  $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-NO}$ , образующегося в реакционной среде, содержащей 0,3 мМ metHb и 12 мМ соли Ангели. (б) 1 – спектр спиновых аддуктов DEPMPO с органическими свободными радикалами, образующимися в смеси, содержащей 0,3 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), 75 мМ DEPMPO и 2 мМ *t*-BOOH (1); 2 – то же что и (1), но вместо metHb смесь содержала  $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-NO}$ , полученный как описано в (а).

Антиоксидантную активность нитроксила также оценивали по влиянию на окисление TMPD [Feng et al., 2005]. Оценку генерации окислителей производили по сумме свободнорадикальных продуктов, образуемых в течение первых 5 минут реакции Hb с *t*-BOOH. Для этого использовали площадь под кривой окисления TMPD. Нитроксильный анион дозозависимо ингибировал выход свободных радикалов (рисунок 3.3.10.).





**Рисунок. 3.3.10. Влияние донора нитроксила – соли Ангели на образование свободнорадикальных продуктов в реакции гемоглобина с пероксидом *трет*-бутила, измеренных с помощью TMPD.** Состав реакционной смеси: 0,03 мМ metHb в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), 1,42 мМ *t*-BOOH, 0,12 мМ TMPD.

Таким образом, результаты исследования показали, что донор нитроксила – соль Ангели может снижать уровень окислительного стресса и повреждение биомолекул, вызванное неферментативным гликированием. Антиоксидантное и антирадикальное действие HNO обусловлено как донорством атома водорода, так и NO.

Сочетание в нитроксилах кардио- и вазопротекторных свойств с антиоксидантным и антигликирующим действием может послужить предпосылкой для разработки на основе доноров нитроксила фармакологических препаратов, обладающих синергетическим терапевтическим действием. Такие препараты могут быть использованы для защиты клеток сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при заболеваниях, сопряженных с окислительным и карбонильным стрессом.

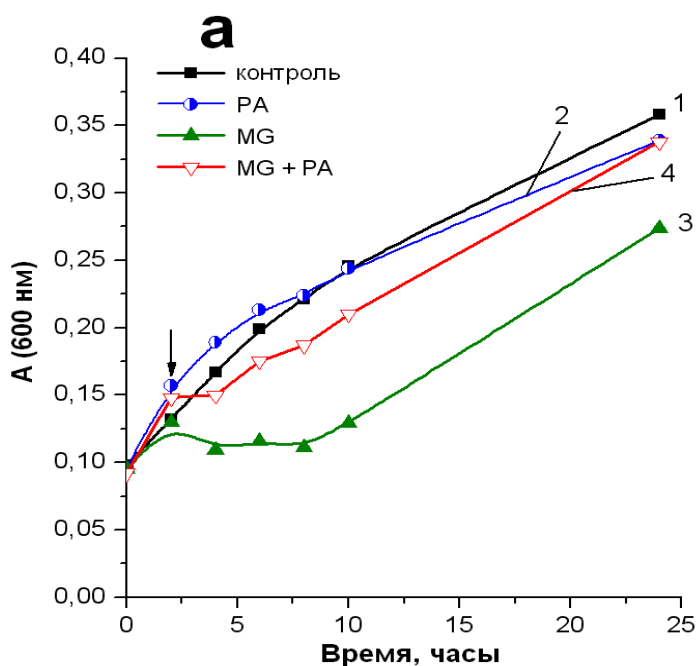
### **3.3.2. Влияние нитроксила на клетки *Escherichia coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса**

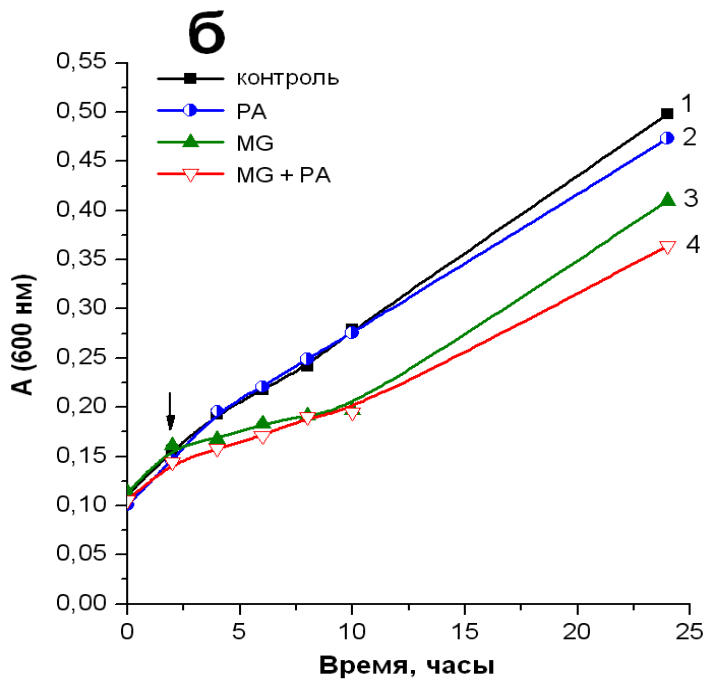
Учитывая, что в экспериментах *in vitro* нитроксил проявил себя как антигликирующий агент, мы решили проверить его влияние на клетки *Escherichia coli*, выращенные в присутствии метилглиоксаля. В качестве донора HNO(NO<sup>-</sup>) использовали кислоту Пилоти, которая медленно ( $k_{\max} \sim 10^{-}$

$3 \div 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$ ) выделяет  $\text{HNO}$  [DuMond, King, 2011]. Метилглиоксаль и кислоту Пилоти вносили в среду культивирования в начале логарифмической фазы роста. Предварительно была подобрана концентрация кислоты Пилоти, не ингибирующая рост бактерий (1 мМ).

Поскольку биологический эффект нитроксила зависит от концентрации кислорода [Shoman, Aly, 2016], в эксперименте использовали два типа культур: растущие в условиях нормальной аэрации (~83% объема колбы заполнено воздухом) и растущие в условиях с пониженной аэрацией (~57% объема колбы заполнено воздухом). Известно, что снижение содержания кислорода в среде культивирования способствует развитию карбонильного стресса в клетках бактерий из-за активации гликолиза [Kosmachevskaya et al., 2015].

Добавление MG приводило к полному подавлению роста низкоаэрируемых бактерий в период с 2 до 10 часов (рисунок 3.3.11. а), в то время как в нормально аэрируемых культурах происходило только замедление роста (рисунок 3.3.11. б). Так же различалось и влияние донора нитроксила на эти культуры. В первом случае  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  оказывал цитопротекторное действие (рисунок 3.3.11. а), во втором случае эффект был незначительным (рисунок 3.3.11. б).

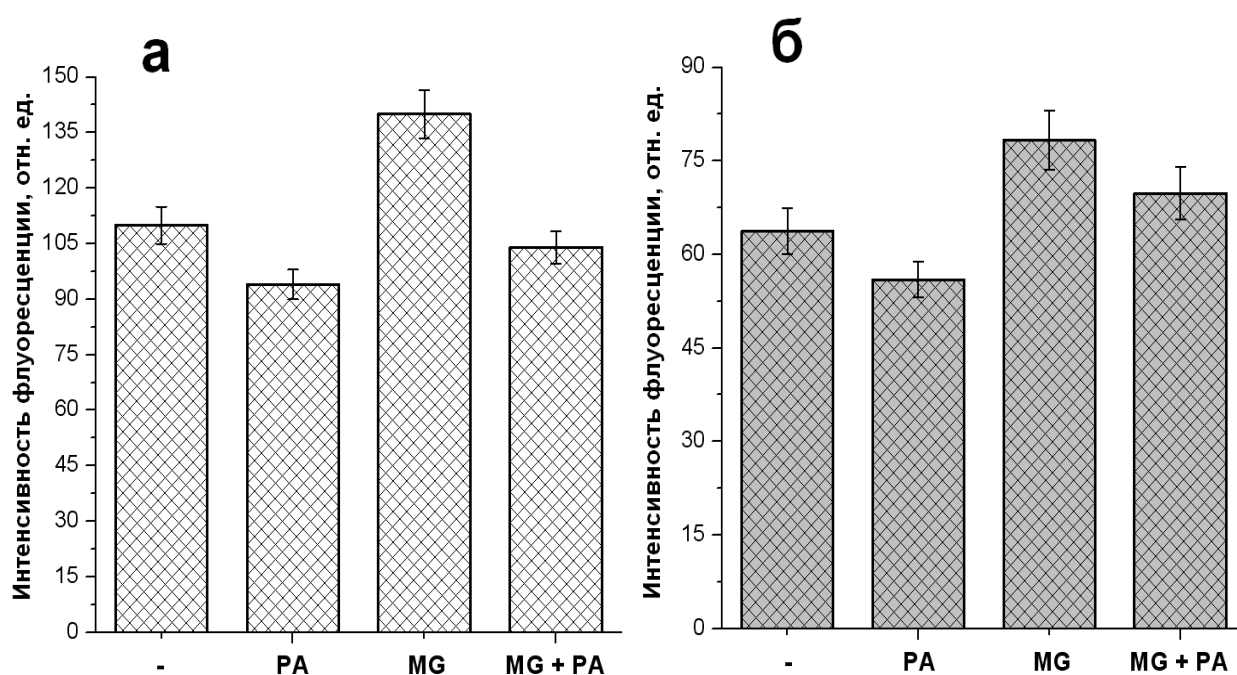




**Рисунок 3.3.11. Влияние метилглиоксаля (MG) и донора нитроксила (кислота Пилоти, Piloty's acid или PA) на рост клеток *E. coli* в условиях пониженной – (а) и нормальной аэрации – (б). Стрелками отмечено добавление MG и/или кислоты Пилоти. 1 – без добавок, 2 – кислота Пилоти, 3 – MG, 4 – MG и кислота Пилоти.**

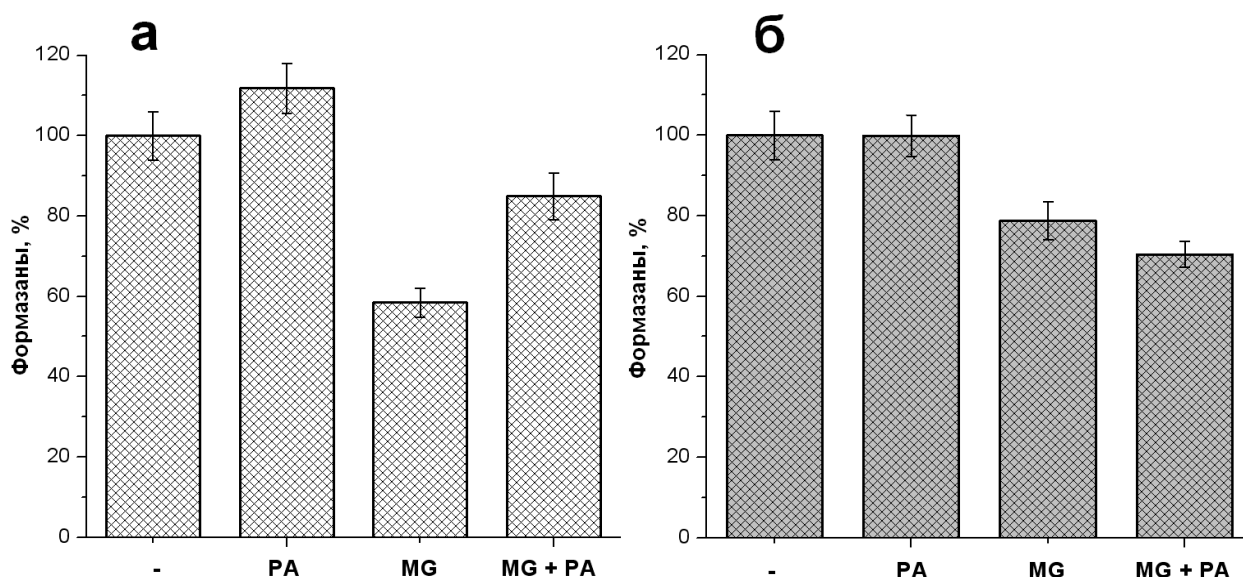
В клетках *E. coli* помимо добавленного MG в процессе культивирования образуются собственные активные карбонильные соединения, которые участвуют в реакциях неферментативного гликирования клеточных белков. Особенно активно эти процессы протекают в культурах, находящихся в стационарной фазе [Rosca et al., 2005; Космачевская, Топунов, 2010]. Поэтому мы решили проверить влияние нитроксила на накопление связанных с белками КППГ через 24 часа культивирования, когда клетки находятся именно в этой фазе. Образование КППГ оценивали по их флуоресценции.

В слабоаэрируемых культурах уровень КППГ практически в два раза превышал их уровень в нормально аэрируемых культурах (рисунок 3.3.12.). Это объясняется активацией гликолиза и связанной с этим повышенной продукцией MG. Добавка MG к обоим типам культур усиливала образование КППГ ~ на 25%, в то время как добавка нитроксила – снижала ~ на 15%. Антигликирующее действие нитроксила на клетки *E. coli* было более выражено в присутствии MG. В слабоаэрируемых культурах нитроксил снижал содержание КППГ до уровня контрольного варианта (без добавок) (рисунок 3.3.12.а).



**Рисунок 3.3.12. Флуоресценция растворимой фракции белков клеточного экстракта *E. coli*. Бактерии выращивали в условиях пониженной аэрации – (а) и нормальной аэрации – (б).  $\lambda_{\text{возб}} = 325$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 492$  нм**

Цитотоксическое и цитопротекторное действие MG и  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  на бактерии оценивали по восстановлению МТТ цитоплазматическими дегидрогеназами (МТТ-тест) до нерастворимого формазана, количество которого коррелирует с метаболической активностью клеток и способностью к делению. Показатели МТТ-теста у слабоаэрируемых культур *E. coli* были на 20% ниже, чем у нормально аэрируемых (рисунок 3.3.13.). При действии MG количество формазанов в обоих типах культур было ниже, чем в контрольном варианте: на 40% в слабоаэрируемых и на 20% в нормально аэрируемых. Нитроксил оказывал цитопротекторное действие только на бактериальные культуры, выращенные в условиях пониженной аэрации (рисунок 3.3.13.а). Эти данные хорошо соотносятся с кривыми роста бактерий (рисунок 3.3.11.)



**Рисунок 3.3.13.** Количество формазанов, образованных в клетках *E. coli*, инкубируемых в течение одного часа с МТТ. *E. coli*, выращенные в условиях пониженной аэрации – (а) и нормальной аэрации – (б). За 100% принято количество формазанов в контрольной культуре.

Карбонильный стресс тесно связан не только с активными формами кислорода, но и с активными метаболитами NO [Kosmachevskaya et al., 2013; 2014; Космачевская с соавт., 2017]. В бактериальных клетках может функционировать несколько путей образования NO и HNO(NO<sup>-</sup>). Первый – восстановление нитратов до аммиака через нитрит. Второй включает окисление аммиака до нитрита через гидросиламин. В анаэробных условиях гидросиламинооксидоредуктаза (КФ 1.7.3.4) окисляет NH<sub>2</sub>OH до NO<sub>2</sub><sup>-</sup> через промежуточные продукты – HNO и NO, диссоциирующие от фермента. Если второй путь присущ почвенным денитрифицирующим бактериям [Caranto, Lancaster, 2017], то первый характерен и для кишечной микрофлоры, включая *E. coli* [Sobko et al., 2005; Tiso, Schechter, 2015]. Еще один путь генерации NO – неферментативное восстановление нитритов при подкислении среды, например, при продукции молочной кислоты. Показано, что культуры *E. coli* превращают нитрит в NO даже при нейтральном pH за счет функционирования различных нитритредуктаз. *E. coli* может использовать нитрат в качестве

конечного акцептора электронов при недостатке кислорода в среде [Tiso, Schechter, 2015].

У денитрификаторов и некоторых патогенов обнаружены редуктазы NO, которые катализируют образование HNO, быстро превращающегося в N<sub>2</sub>O. При восстановлении NO бактериальным флавогемоглобином (Hmp) также возможно образование NO<sup>-</sup>, в дальнейшем трансформирующегося в N<sub>2</sub>O [Hausladen et al., 2001], причем синтез самого Hmp при аноксии запускается через нитрозилирование кластеров 4Fe-4S в транскрипционном регуляторе FNR. Нитроксил может образовываться при перекисном окислении азотсодержащих субстратов (гидроксиламина, гидроксимочевины, гидроксамовых кислот), катализируемого гемовыми белками [Reisz et al., 2010], в ходе неферментативных реакций NO с тиолами [Suarez et al., 2017] и за счет распада ДНКЖ [Liu et al., 2018; Shumaev et al., 2017].

Нитроксил – короткоживущее соединение, которое сложно детектировать в организмах. В бактериях обнаружены метаболиты различной структуры, к которым присоединена нитроксильная группа. Многие такие метаболиты существуют как нитроксильные радикалы. Например, у *Micrococcus luteus* идентифицированы гидроксилламинные соединения (лизодектоза и аммонигенин), переходящие в долгоживущие нитроксильные радикалы [Арцатбанов с соавт., 2009].

В биологических системах нитроксильный анион может функционировать и как антиоксидант, и как прооксидант. При повышении концентрации кислорода происходит инверсия антиоксидантных свойств нитроксила в прооксидантные. Поэтому в гипоксических условиях значительно снижается токсичность этого соединения [Shoman, Aly, 2016; Smulik et al., 2014].

Есть много данных об антиоксидантном и антирадикальном действии нитроксила. Так, в условиях окислительного стресса HNO(NO<sup>-</sup>) повышает выживаемость дрожжевых клеток, дефицитных по коэнзиму Q, и ингибирует реакции ПОЛ [Lopez et al., 2007], что, по-видимому, обусловлено

восстановлением липидных свободных радикалов. Доноры нитроксила – соль Ангели и кислота Пилюти количественно ингибируют ПОЛ в гомогенизированном препарате сердечной мышцы крыс. Нитроксил может снижать продукцию супероксида как за счет ингибирования NADPH-оксидазы [Lin et al., 2012], так и за счет ингибирования активности I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий [Shiva et al., 2004]. Антиоксидантное действие нитроксила может быть связано и с образованием ДНКЖ (п. 3.2.1), поскольку нитрозильные комплексы гемового и негемового железа являются эффективными антиоксидантами (п. 3.1.1.).

Прооксидантное действие  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  прежде всего определяется его реакцией с кислородом, в которой образуется пероксинитрит, вызывающий необратимую модификацию белков, мутации и разрыв ДНК [Shoman, Aly, 2016; Smulik et al., 2014; Doctorovich et al., 2014]. В отличие от реакции NO с супероксидом, эта реакция не контролируется СОД (КФ 1.15.1.1). Автоокисление HNO обычно происходит в клеточных мембранах, где концентрация антиоксидантов низка. К тому же  $\text{NO}^-$ , восстанавливая ионы металлов переменной валентности, катализирует образование гидроксильного радикала в реакции Фентона. Это объясняет отсутствие положительного эффекта нитроксила на хорошо аэрируемую бактериальную культуру. В этом случае повышение концентрации кислорода в культуральной среде способствует как образованию пероксинитрита, так и появлению супероксида в реакциях неферментативного гликирования. Нитроксил способен подавлять дыхание, ингибируя цитохромы за счет модификации специфических остатков цистеина [Sobko et al., 2005; Shiva et al., 2004] и образования железонитрозильных комплексов с гемовым железом в реакции восстановительного нитрозилирования [Doctorovich et al., 2014]. Также нельзя исключить ингибирующее действие HNO на ключевой фермент гликолиза – 1,3-дифосфоглицератдегидрогеназу (КФ 1.1.1.95). Это объясняет причину

более высокой токсичности HNO для микроорганизмов, у которых существенный вклад в получение энергии вносит гликолиз.

Цитопротекторное действие нитроксила на бактерии при пониженной аэрации можно объяснить проявлением его антиоксидантных и антигликирующих свойств (п. 3.1.1.). Помимо непосредственного антиоксидантного или прооксидантного действия, HNO(NO<sup>-</sup>) может влиять на метаболизм клетки за счет модификации гемовых белков, а также белков, содержащих реакционноспособные тиолы и Fe-S-кластеры [Sobko et al., 2005; Bianco et al., 2017]. Эти белки выполняют сигнальную и регуляторную функцию, что приводит к изменению экспрессии генов и синтезу защитных ферментов. Причем HNO, в отличие от NO, может непосредственно взаимодействовать с тиолами, тиолсодержащими белками и окисленным гемовым железом. Влияние нитроксила на метаболизм может быть также связано с NO, который образуется либо в результате окисления HNO двухэлектронными окислителями, например, FAD, либо при восстановительном нитрозилировании гемопротеидов HNO.

Таким образом, нитроксил защищает низкоаэрируемые клетки *E. coli* от карбонильного стресса, индуцированного MG. Этот цитопротекторный эффект может быть обусловлен снижением уровня ассоциированных с белками свободных радикалов и продуктов неферментативного гликирования, возникающих при взаимодействии аминокислотных остатков с MG. Нитроксил также может выполнять сигнально-регуляторную функцию в клетке.

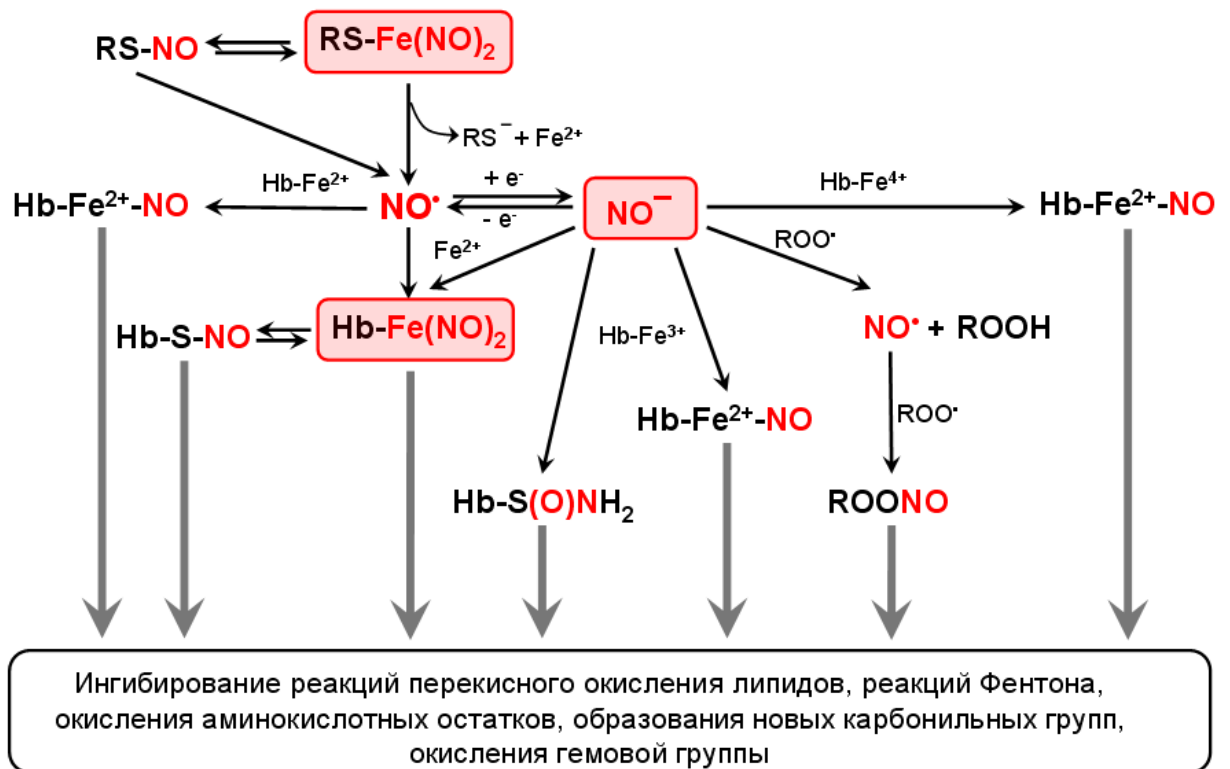


## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в диссертационной работе данные свидетельствуют, что функции ДНКЖ в биологических системах не ограничиваются депонированием и транспортом NO. Эти комплексы могут быть регуляторами процессов, связанных с окислительным стрессом. В частности, в различных экспериментальных системах, содержащих липиды и белки, было показано, что ДНКЖ проявляют антиоксидантное и антирадикальное действие. Это их свойство имеет важное значение для использования динитрозильных комплексов в медицинской практике. Исследование анти- и прооксидантного аспекта функционирования ДНКЖ может способствовать обнаружению новых сигнально-регуляторных путей оксида азота в биологических системах.

Функционирование ДНКЖ тесно связано с таким метаболитом NO, как нитроксильный анион ( $\text{NO}^-$ ), который в физиологических условиях преимущественно существует в виде нитроксила (HNO). В работе было продемонстрировано антиоксидантное действие нитроксила в системе окисления гемоглобина органической гидроперекисью. Так же, как и в случае ДНКЖ, основу антиоксидантных эффектов составляют реакции  $\text{NO}^-$  или NO с гемовой группой и липидными радикалами, а также способность восстанавливать оксоферрильную форму гемоглобина, являющуюся сильным окислителем. Данные процессы в общем виде представлены на схеме (рисунок 4).

Необходимо отметить, что и сами низкомолекулярные лиганды ДНКЖ (например, цистеин, глутатион, липоевая кислота) могут быть антиоксидантами. Кроме этого, связанное в комплексах двухвалентное железо менее реакционноспособно, по сравнению со свободным. Еще одним важным аспектом является образование S-нитрозотиолов (RSNO). S-нитрозилирование – обратимая посттрансляционная модификация, которая, с одной стороны, защищает белковые тиолы от окисления, а, с другой стороны, является медиатором биологического действия эндогенного NO.



**Рисунок 4. Процессы, обеспечивающие антиоксидантное действие ДНКЖ и HNO(NO<sup>-</sup>) в системах, содержащих гемоглобин и липиды.**

### Выводы

1) Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с глутатионовыми лигандами ингибируют свободнорадикальное перекисное окисление в липопротеидах низкой плотности, липосомах и мицеллах из полиненасыщенных жирных кислот.

2) Динитрозильные комплексы железа с тиоловыми лигандами перехватывают пероксинитрит. При этом включение тиоловых лигандов в состав ДНКЖ в форме тиолат-анионов, защищает эти группы от окисления.

3) Показано формирование ДНКЖ с тиоловыми лигандами в митохондриях, связанное с модификацией железосодержащих белков активными формами кислорода и азота. NO для синтеза комплексов образуется в реакции S-нитрозотиолов с супероксидом или при одноэлектронном окислении нитроксила коферментом Q.

4) Нитроксил участвует в регенерации липофильного антиоксиданта –  $\alpha$ -токоферола, а также в образовании ДНКЖ с тиоловыми лигандами.

5) Нитроксил защищает гемоглобин от окислительной модификации, замедляя образование новых карбонильных групп, межсубъединичных сшивок и деградацию гемовой группы. Эти эффекты частично обусловлены способностью нитроксила снижать выход свободнорадикальных продуктов реакции гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила.

6) Нитроксил ингибирует реакцию неферментативного гликирования гемоглобина метилглиоксалем. Антигликирующее действие нитроксила связано с его антиоксидантным и антирадикальным действием.

7) Нитроксил снижает токсическое действие метилглиоксала на бактериальную культуру, повышая жизнеспособность клеток, и снижает количество связанных с белками продуктов неферментативного гликирования.

## Благодарности

Выражаю свою искреннюю благодарность моему научному руководителю, старшему научному сотруднику лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота, кандидату биологических наук Ольге Владимировне Космачевской за постоянную помощь и поддержку при выполнении моей диссертационной работы. Она помогала планировать и проводить эксперименты, обучала меня экспериментальным методикам, формировала необходимые навыки для работы.

Выражаю глубокую благодарность заведующему лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота, доктору биологических наук Алексею Федоровичу Топунову, который пригласил меня в свою лабораторию и предложил поступать в аспирантуру. Алексей Федорович поддерживал меня во время учебы, давал ценные советы, помогал в непростых ситуациях и являлся примером для подражания.

Хочу поблагодарить доктора биологических наук Константина Борисовича Шумаева, который руководил моей дипломной работой в Институте биохимии им. А.Н. Баха и много помогал во время обучения в аспирантуре. С ним я постигал основы экспериментальной деятельности и научного ремесла.

Благодарю научного сотрудника этой же лаборатории кандидата биологических наук Эльвиру Ильгизовну Насыбуллину за помощь в проведении экспериментов и дружескую поддержку, а всех сотрудников лаборатории за доброжелательное отношение ко мне и моей работе.

Хочу выразить свою признательность главному научному сотруднику НИИ экспериментальной кардиологии, доктору физико-математических наук, профессору Энно Куставичу Рууге, на базе лаборатории которого были выполнены эксперименты по ЭПР спектроскопии, и сотрудникам его лаборатории за помощь в выполнении экспериментов.

Спасибо моей семье, оказывавшей мне моральную поддержку в течение всего срока работы над диссертацией.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aga R. G., Hughes M. N. Chemistry of nitric oxide and related species // *Methods Enzymol.* – 2008. – V. 436. – P. 35-48.
2. Ahmed N. Advanced glycation endproducts — role in pathology of diabetic complications // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2005. – V. 67, № 1. – P. 3-21.
3. Akentieva N. P., Sanina N. A., Gizatullin A. R., Shkondina N. I., Prihodchenko T. R., Shram S. I., Zhelev N., Aldoshin S. M. Cytoprotective effects of dinitrosyl iron complexes on viability of human fibroblasts and cardiomyocytes // *Frontiers in Pharmacology.* — 2019. — V. 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01277>.
4. Akentieva N., Sanina N., Gizatullin A., Aldoshin S., Shushanov S. DNIC (nitric oxide donor) suppresses the expression of matrix metalloproteinase and poly(ADP-ribose)polymerase genes in human multiple myeloma cells // *Biointerface Research in Applied Chemistry.* — 2023. — V. 13.
5. Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // *Biochem. J.* – 2001. – V. 357. – P. 593-615.
6. Allan R. N., Kelso M. J., Rineh A., Yepuri N. R., Feelisch M., Soren O., Brito-Mutunayagam S., Salib R. J., Stoodley P., Clarke S. C., Webb J. S., Hall-Stoodley L., Faust S. N. Cephalosporin-NO-donor prodrug PYRRO-C3D shows  $\beta$ -lactam-mediated activity against *Streptococcus pneumoniae* biofilms // *Nitric Oxide.* – 2017. – V. 65. – P. 43-49.
7. Amicarelli F., Colafarina S., Cattani F., Cimini A., Di Ilio C., Ceru M. P., Miranda M. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury // *Free Radic Biol Med.* – 2003. – V. 35, № 8. – P. 856-871.
8. Andjelkovic M., Camp J., Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhé R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups // *Food Chemistry.* – 2006. – V. 98. – P. 23-31.
9. Andrews K. L., Irvine J. C., Tare M., Apostolopoulos J., Favaloro J. L., Triggle C. R., Kemp-Harper B. K. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries // *Br J Pharmacol.* – 2009. – V. 157, № 4. – P. 540-550.
10. Andrews K. L., Lumsden N. G., Farry J., Jefferis A. M., Kemp-Harper B. K., Chin-Dusting J. P. Nitroxyl: a vasodilator of human vessels that is not susceptible to tolerance // *Clin Sci (Lond).* – 2015. – V. 129, № 2. – P. 179-187.
11. Andreyev-Andriyevsky A. A., Mikoyan V. D., Serezhenkov V. A., Vanin A. F. Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // *Nitric Oxide.* – 2011. – V. 24, № 4. – P. 217-223.

12. Angeli. A., Rimini. E. Nitrohydroxylamine // *Gazz. Chim. Ital.* – 1896. – V. 26 – P. 17-25.
13. Arfin S., Siddiqui G. A., Naeem A., Moin S. Inhibition of advanced glycation end products by isoferulic acid and its free radical scavenging capacity: An in vitro and molecular docking study // *Int J Biol Macromol.* – 2018. – V. 118, № Pt B. – P. 1479-1487.
14. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products // *Kidney Int.* – 2000. – V. 58, № 4. – P. 1780-7.
15. Auch`ere F., Rusnak F. What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2002. – V. 37. – P. 664–667.
16. Balakumar P., Rohilla A., Krishan P., Solairaj P., Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine // *Pharmacol Res.* – 2010. – V. 61, № 6. – P. 482-488.
17. Bari S. E., Martí M. A., Amorebieta V. T., Estrin D. A., Doctorovich F. Fast nitroxyl trapping by ferric porphyrins // *J Am Chem Soc.* – 2003. – V. 125, № 50. – P. 15272-15273.
18. Baron C. P., Moller J. K., Skibsted L. H., Andersen H. J. Nitrosylmyoglobin as antioxidant-kinetics and proposed mechanism for reduction of hydroperoxides // *Free Radic Res.* – 2007. – V. 41, № 8. – P. 892-902.
19. Barouh N., Bourlieu-Lacana C., Figueroa-Espinoza M.C., Durand E., Villeneuve P. Tocopherols as antioxidants in lipid-based systems: The combination of chemical and physicochemical interactions determines their efficiency // *Compr Rev Food Sci Food Saf.* – 2021. – P. 1-47.
20. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration // *Redox Biol.* – 2018. – V. 14. – P. 618-625.
21. Baynes J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // *Diabetes.* – 1991. – V. 40. – P. 405-412.
22. Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – V. 87. – P. 1620-1624.
23. Beckman J. S., Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly // *Am J Physiol.* – 1996. – V. 271, № 5 Pt 1. – P. 1424-1437.
24. Bhakta-Guha D., Efferth T. Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2015. – V. 8, № 4. – P. 865-883.

25. Bianco C. L., Toscano J. P., Bartberger M. D., Fukuto J. M. The chemical biology of HNO signaling // *Arch Biochem Biophys.* – 2017. – V. 617. – P. 129-136.
26. Biemond P., Swaak A. J., van Eijk H. G., Koster J. F. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases // *Free Radic. Biol. Med.* – 1988. – V. 4., № 3. – P. 185-198.
27. Bleier L., Dröse S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1827., №11-12 – P. 1320-1331.
28. Bocedi A., Fabrini R., Farrotti A., Stella L., Ketterman A. J., Pedersen J. Z., Allocati N., Lau P. C., Grosse S., Eltis L. D., Ruzzini A., Edwards T. E., Morici L., Del Grosso E., Guidoni L., Bovi D., Lo Bello M., Federici G., Parker M. W., Board P. G., Ricci G. The impact of nitric oxide toxicity on the evolution of the glutathione transferase superfamily: a proposal for an evolutionary driving force // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288, № 34. – P. 24936-24947.
29. Boese M., Keese M. A., Becker K., Busse R., Mülsch A. Inhibition of glutathione reductase by dinitrosyl-iron-dithiolate complex // *J Biol Chem.* – 1997. – V. 272, № 35. – P. 21767-21773.
30. Bosworth C., Toledo jr J., Zmijewski J., Li Q., Lancaster J. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – V. 106. – P. 4671-4676.
31. Brand M. D. Riding the tiger - physiological and pathological effects of superoxide and hydrogen peroxide generated in the mitochondrial matrix // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2020. – V. 55, № 6. – P. 592-661.
32. Breuer W., Shvartsman M., Cabantchik Z. I. Intracellular labile iron // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2008. – V. 40, № 3. – P. 350-4.
33. Brings S., Fleming T., Freichel M., Muckenthaler M. U., Herzig S., Nawroth P. P. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention // *Int J Mol Sci.* – 2017. – V. 18, № 5.
34. Bucala R., Tracey K. J., Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes // *J Clin Invest.* – 1991. – V. 87, № 2. – P. 432-438.
35. Bunn H. F., Higgins P. J. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance // *Science.* – 1981. – V. 213, № 4504. – P. 222-224.
36. Burr S. D., Stewart J. A. Jr. Rapla regulates cardiac fibroblast contraction of 3D diabetic collagen matrices by increased activation of the AGE/RAGE Cascade // *Cells.* – 2021. – V. 10, № 6. doi: 10.3390/cells10061286.

37. Camiolo G., Barbato A., Giallongo C., Vicario N., Romano A., Parrinello N. L., Parenti R., Sandoval J. C., García-Moreno D., Lazzarino G., Avola R., Palumbo G. A., Mulero V., Li Volti G., Tibullo D., Di Raimondo F. Iron regulates myeloma cell/macrophage interaction and drives resistance to bortezomib // *Redox Biol.* – 2020. – V. 36. – P. 101611.
38. Cao X., Xia Y., Zeng M., Wang W., He Y., Liu J. Caffeic acid inhibits the formation of advanced glycation end products (AGEs) and mitigates the AGEs-induced oxidative stress and inflammation reaction in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) // *Chem Biodivers.* – 2019. – V. 16, № 10. – P. e1900174.
39. Caranto J. D., Lancaster K. M. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2017. – V. 114. – P. 8217-8222.
40. Chakraborty S., Gogoi M., Chakravorty D. Lactoylglutathione lyase, a critical enzyme in methylglyoxal detoxification, contributes to survival of Salmonella in the nutrient rich environment // *Virulence* – 2015. – V. 6. – P. 50-65.
41. Chamorro Á., Dirnagl U., Urra X., Planas A. M. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation // *Lancet Neurol.* – 2016. – V. 15, № 8. – P. 869-881.
42. Chatterji A., Sengupta R. Stability of S-nitrosothiols and S-nitrosylated proteins: A struggle for cellular existence! // *J Cell Biochem.* – 2021. – V. 122, № 11. – P. 1579-1593.
43. Chavakis T., Bierhaus A., Al-Fakhri N., Schneider D., Witte S., Linn T., Nagashima M., Morser J., Arnold B., Preissner K. T., Nawroth P. P. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment // *J Exp Med.* – 2003. – V. 198, № 10. – P. 1507-1515.
44. Chazov E. I., Rodnenkov O. V., Zorin A. V., Lakomkin V. L., Gramovich V. V., Vyborov O. N., Dragnev A. G., Timoshin C. A., Buryachkovskaya L. I., Abramov A. A., Massenko V. P., Arzamastsev E. V., Kapelko V. I., Vanin A. F. Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers // *Nitric Oxide.* 2012. – V. 26, № 3. – P. 148-156.
45. Chen X., Zhong Z., Xu Z., Chen L., Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy // *Free Radic Res.* – 2010. – V. 44, № 6. – P. 587-604.



46. Cooper R. A., Anderson A. The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli* // *FEBS Lett.* – 1970. – V. 11, № 4. – P. 273-276.
47. Cortese-Krott M. M., Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? // *Redox Biol.* – 2014. – V. 2. – P. 251-258.
48. Crack J. C., Green J., Thomson A. J., Le Brun N. E. Iron-sulfur clusters as biological sensors: the chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide // *Acc Chem Res.* – 2014. – V. 47, № 10. – P. 3196-3205.
49. Crack J. C., Le Brun N. E. Mass spectrometric identification of [4Fe-4S](NO)(x) intermediates of nitric oxide sensing by regulatory iron-sulfur cluster proteins // *Chemistry.* – 2019. – V. 25, № 14. – P. 3675-3684.
50. Crow J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species // *Nitric Oxide.* – 1997. – P. 145-157.
51. Daiber A., Daub S., Bachschmid M., Schildknecht S., Oelze M., Steven S., Schmidt P., Megner A., Wada M., Tanabe T., Münzel T., Bottari S., Ullrich V. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications // *Int J Mol Sci.* – 2013. – V. 14, № 4. – P. 7542-7570.
52. Damasceno F. C., Condeles A. L., Lopes A. K. B., Facci R. R., Linares E., Truzzi D. R., Augusto O., Toledo Jr. J. C., The labile iron pool attenuates peroxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source // *J Biol Chem.* – 2018. – V. 293, № 22. – P. 8530-8542.
53. Damasceno F. C., Toledo Jr. J. C., Condeles A. L., Lopes A. K. B., Facci R. R., Linares E., Truzzi D. R., Augusto O. Can cellular labile iron pool be considered solely a pro-oxidant species in cells? // *The FASEB Journal.* – 2019. – V. 33, № S1. – P. 351.
54. Dattilo S., Mancuso C., Koverech G., Di Mauro P., Ontario M. L., Petralia C. C., Petralia A., Maiolino L., Serra A., Calabrese E. J., Calabrese V. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases // *Immun Ageing.* – 2015. – V. 12. – P. 20.
55. De Maria F., Pedersen J. Z., Caccuri A. M., Antonini G., Turella P., Stella L., Lo Bello M., Federici G., Ricci G. The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily: suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278, № 43. – P. 42283-42293.

56. De Zwart L. L., Meerman J. H. N., Commandeur J. N. M., Vermeulen N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans // *Free Radic Biol Med.* – 1999. – V. 26. – P. 202-226.
57. Deluyker D., Evens L., Bito V. Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs // *Amino Acids.* – 2017. – V. 49, № 9. – P. 1535-1541.
58. Desnues B., Cuny C., Grégori G., Dukan S., Aguilaniu H., Nyström T. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells // *EMBO Rep.* – 2003. – V. 4, № 4. – P. 400-404.
59. Dezfulian C., Raat N., Shiva S., Gladwin M. T. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics // *Cardiovasc Res.* – 2007. – V. 75, № 2. – P. 327-338.
60. Dhar I., Desai K. Aging: Drugs to eliminate methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, and advanced glycation endproducts // *Pharmacology.* – 2012. – P. 681-708.
61. Di Loreto S., Caracciolo V., Colafarina S., Sebastiani P., Gasbarri A., Amicarelli F. Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells // *Brain Res.* – 2004. – V. 1006, № 2. – P. 157-167.
62. Dikalov S. I., Mayorov V. I., Panov A. V. Physiological levels of nitric oxide diminish mitochondrial superoxide. Potential role of mitochondrial dinitrosyl iron complexes and nitrosothiols // *Front Physiol.* – 2017. – V. 8. – P. 907.
63. Doctorovich F., Bikiel D. E., Pellegrino J., Suárez S. A., Martí M. A. Reactions of HNO with metal porphyrins: underscoring the biological relevance of HNO // *Acc Chem Res.* – 2014. – V. 47, № 10. – P. 2907-2916.
64. Donzelli S., Espey M. G., Thomas D. D., Mancardi D., Tocchetti C. G., Ridnour L. A., Paolocci N., King S. B., Miranda K. M., Lazzarino G., Fukuto J. M., Wink D. A. Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 40, № 6. – P. 1056-1066.
65. Doulias P. T., Greene J. L., Greco T. M., Tenopoulou M., Seeholzer S. H., Dunbrack R. L., Ischiropoulos H. Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107, № 39. – P. 16958-16963.
66. Doyle M. P., Hoekstra J. W. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins // *J Inorg Biochem.* – 1981. – V. 14, № 4. – P. 351-8.

67. Dukan S., Nyström T. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon // *Genes Dev.* – 1998. – V. 12, № 21. – P. 3431-3441.
68. DuMond J. F., King S. B. The chemistry of nitroxyl-releasing compounds // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14, № 9. – P. 1637-1648.
69. Dungal P., Perlinger M., Weidinger A., Redl H., Kozlov A. V. The cytoprotective effect of nitrite is based on the formation of dinitrosyl iron complexes // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – V. 89. – P. 300-310.
70. Ekanger L. A., Oyala P. H., Moradian A., Sweredoski M. J., Barton J. K. Nitric oxide modulates endonuclease III redox activity by a 800 mV negative shift upon [Fe(4)S(4)] cluster nitrosylation // *J Am Chem Soc.* – 2018. – V. 140, № 37. – P. 11800-11810.
71. Elostá A., Ghous T., Ahmed N. Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications // *Curr Diabetes Rev.* – 2012. – V. 8, № 2. – P. 92-108.
72. Espey M. G., Miranda K. M., Thomas D. D., Wink D. A. Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – V. 33, № 6. – P. 827-834.
73. Fabisiak J. P., Sedlov A., Kagan V. E. Quantification of oxidative/nitrosative modification of Cys(34) in human serum albumin using a fluorescence-based SDS-PAGE assay // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – V. 4, № 5. – P. 855-865.
74. Farmer P. J., Sulc F. Coordination chemistry of the HNO ligand with hemes and synthetic coordination complexes // *J Inorg Biochem.* – 2005. – V. 99, № 1. – P. 166-184.
75. Farre A. L., Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction // *Hypertension.* – 2001. – V. 38. – № 6. – P. 1400-1405.
76. Feng L., Zhou S., Gu L., Gell D. A., Mackay J. P., Weiss M. J., Gow A. J., Shi Y. Structure of oxidized alpha-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem // *Nature.* – 2005. – V. 435, № 7042. – P. 697-701.
77. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron // *J Chem Soc.* – 1894. – V.65. – P. 899-910.
78. Flinck M., Kramer S. H., Pedersen S. F. Roles of pH in control of cell proliferation // *Acta Physiol (Oxf).* – 2018. – V. 223, № 3. – P. e13068.
79. Flores-Santana W., Salmon D. J., Donzelli S., Switzer C. H., Basudhar D., Ridnour L., Cheng R., Glynn S. A., Paolocci N., Fukuto J. M., Miranda K. M., Wink D. A. The specificity of nitroxyl chemistry is unique among nitrogen oxides in biological systems // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14, № 9. – P. 1659-1674.

80. Flores-Santana W., Switzer C., Ridnour L. A., Basudhar D., Mancardi D., Donzelli S., Thomas D. D., Miranda K. M., Fukuto J. M., Wink D. A. Comparing the chemical biology of NO and HNO // *Arch Pharm Res.* – 2009. – V. 32, № 8. – P. 1139-1153.
81. Ford P. C., Miranda K. M. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species // *Nitric Oxide.* – 2020. – V. 103. – P. 31-46.
82. Ford P., Pereira J., Miranda K. Mechanisms of nitric oxide reactions mediated by biologically relevant metal centers // *Structure and Bonding.* – 2013. – P. 99-135.
83. Forman H. J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy // *Nat Rev Drug Discov.* – 2021. – V. 20, № 9. – P. 689-709.
84. Foster M. W., Stamler, J. S. New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 25891-25897.
85. Fukuto J. M. A recent history of nitroxyl chemistry, pharmacology and therapeutic potential // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V. 176, № 2. – P. 135-146.
86. Fukuto J. M., Bartberger M. D., Dutton A. S., Paolocci N., Wink D. A., Houk K. N. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide // *Chem Res Toxicol.* – 2005. – V. 18, № 5. – P. 790-801.
87. Fukuto J. M., Bianco C. L., Chavez T. A. Nitroxyl (HNO) signaling // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – V. 47, № 9. – P. 1318-1324.
88. Fukuto J. M., Carrington S. J. HNO signaling mechanisms // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14, № 9. – P. 1649-1657.
89. Fukuto J. M., Dutton A. S., Houk K. N. The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity // *Chembiochem.* – 2005. – V. 6, № 4. – P. 612-619.
90. Fukuto J. M., Switzer C. H., Miranda K. M., Wink D. A. Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2005. – V. 45. – P. 335-355.
91. Gammella E., Recalcati S., Rybinska I., Buratti P., Cairo G. Iron-induced damage in cardiomyopathy: oxidative-dependent and independent mechanisms // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – V. 2015. – P. 230182.
92. Giardino I., Fard A. K., Hatchell D. L., Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis // *Diabetes.* – 1998. – V. 47, № 7. – P. 1114-1120.
93. Gkogkolou P., Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? // *Dermatoendocrinol.* – 2012. – V. 4, № 3. – P. 259-270.

94. Goldberg T., Cai W., Peppas M., Dardaine V., Baliga B. S., Uribarri J., Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods // *J Am Diet Assoc.* – 2004. – V. 104, № 8. – P. 1287-1291.
95. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The Fenton reagents // *Free Radic Biol Med.* – 1993. – V. 15, № 4. – P. 435-445.
96. Gonçalves C. A., Rodrigues L., Bobermin L. D., Zanotto C., Vizueti A., Quincozes-Santos A., Souza D. O., Leite M. C. Glycolysis-derived compounds from astrocytes that modulate synaptic communication // *Front Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 1035.
97. Goodarzi M., Moosavi-Movahedi A. A., Habibi-Rezaei M., Shourian M., Ghourchian H., Ahmad F., Farhadi M., Saboury A. A., Sheibani N. Hemoglobin fructation promotes heme degradation through the generation of endogenous reactive oxygen species // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2014. – V. 130. – P. 561-567.
98. Gorbunov N. V., Osipov A. N., Day B. W., Zayas-Rivera B., Kagan V. E., Elsayed N. M. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34, № 20. – P. 6689-6699.
99. Griffiths H. R. Chemical modifications of biomolecules by oxidants // *Reactions, Processes.* – Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. – P. 33-62.
100. Grillo M. A., Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases // *Amino Acids.* – 2008. – V. 35, № 1. – P. 29-36.
101. Groves J. T., Wang C. C.-Y. Nitric oxide synthase: model and mechanisms // *Cur Opin Chem Biol.* – 2000. – V. 4. – P. 687-695.
102. Gudkov L. L., Shumaev K. B., Kalenikova E. I., Gubkina S. A., Vanin A. F., Ruuge E. K. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites // *Biofizika.* – 2007. – V. 52, № 3. – P. 503-509.
103. Gugliucci A. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases // *Adv Nutr.* – 2017. – V. 8, № 1. – P. 54-62.
104. Guo C. J., Atochina-Vasserman E. N., Abramova E., Smith L. C., Beers M. F., Gow A. J. Surfactant protein-D modulation of pulmonary macrophage phenotype is controlled by S-nitrosylation // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2019. – V. 317, № 5. – P. 539-549.
105. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. / Oxford University Press, USA, 2015.

106. Hausladen A., Gow A., Stamler J. S. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – V. 98. – P. 10108-10112.
107. Herold S., Shivashankar K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxyxynitrite to nitrate // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42, № 47. – P. 14036-14046.
108. Hickok J. R., Sahni S., Shen H., Arvind A., Antoniou C., Fung L. W., Thomas D. D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – V. 51, № 8. – P. 1558-1566.
109. Hider R. C., Kong X. L. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool // *Biometals.* – 2011. – V. 24, № 6. – P. 1179-1187.
110. Higdon A. N., Landar A., Barnes S., Darley-Usmar V. M. The electrophile responsive proteome: integrating proteomics and lipidomics with cellular function // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – V. 17, № 11. – P. 1580-1589.
111. Hoff S., Larsen F. H., Andersen M. L., Lund M. N. Quantification of protein thiols using ThioGlo 1 fluorescent derivatives and HPLC separation // *Analyst.* – 2013. – V. 138, № 7. – P. 2096-2103.
112. Hogg N., Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation // *Biochim Biophys Acta.* – 1999. – V. 1411, № 2-3. – P. 378-384.
113. Hogg N., Kalyanaraman B., Joseph J., Struck A., Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 334, № 2. – P. 170-174.
114. Houben J. M., Moonen H. J., van Schooten F. J., Hageman G. J. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – V. 44, № 3. – P. 235-246.
115. Huang G., Lv M., Hu J., Huang K., Xu H. Glycosylation and activities of natural products // *Mini Rev Med Chem.* – 2016. – V. 16, № 12. – P. 1013-1016.
116. Huang K. T., Keszler A., Patel N., Patel R. P., Gladwin M. T., Kim-Shapiro D. B., Hogg N. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin: reassessment of reaction kinetics and stoichiometry // *J Biol Chem.* – 2005. – V. 280, № 35. – P. 31126-31131.
117. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D. B., Patel R. P., Ringwood L. A., Irby C. E., Huang K. T., Ho C., Hogg N., Schechter A. N., Gladwin M. T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control // *J Clin Invest.* – 2005. – V. 115, № 8. – P. 2099-2107.
118. Huie R. E., Padmaja S. The reaction of no with superoxide // *Free Radic Res Commun.* – 1993. – V. 18, № 4. – P. 195-199.

119. Iglesias D. E., Bombicino S. S., Valdez L. B., Boveris A. Nitric oxide interacts with mitochondrial complex III producing antimycin-like effects // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – V. 89. – P. 602-613.
120. Igrunkova A., Fayzullin A., Serejnikova N., Lipina T., Pekshev A., Vanin A., Zaborova V., Budanova E., Shestakov D., Kastyro I., Shekhter A. Beneficial effects of dinitrosyl iron complexes on wound healing compared to commercial nitric oxide plasma generator // *Int J Mol Sci.* – 2023. – V. 24, № 5. – P.4439.
121. Ingram T. E., Fraser A. G., Bleasdale R. A., Ellins E. A., Margulescu A. D., Halcox J. P., James P. E. Low-dose sodium nitrite attenuates myocardial ischemia and vascular ischemia-reperfusion injury in human models // *J Am Coll Cardiol.* – 2013. – V. 61, № 25. – P. 2534-2541.
122. In-iam A., Wolf M., Wilfer C., Schaniel D., Woike T., Kluefers P. {FeNO}<sup>7-</sup>-type halogenido nitrosyl ferrates: syntheses, bonding, and photoinduced linkage isomerism // *Chemistry.* – 2018. – V. 25. DOI: 10.1002/chem.201804565.
123. Jakus V., Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications // *Physiol Res.* – 2004. – V. 53, № 2. – P. 131-142.
124. James A. M., Cochemé H. M., Smith R. A. J., Murphy M. P. Interaction of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species: implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools // *J Biol Chem.* – 2005. – V.280., № 22. – P. 21295-21312.
125. Kalapos M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal // *Chem Biol Interact.* – 2008. – V. 171, № 3. – P. 251-271.
126. Kanner J., Harel S. Initiation of membranial lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin // *Arch Biochem Biophys.* – 1985. – V. 237, № 2. – P. 314-321.
127. Kapelko V. I., Lakomkin V. L., Abramov A. A., Lukoshkova E. V., Undrovinas N. A., Khapchaev A. Y., Shirinsky V. P. Protective effects of dinitrosyl iron complexes under oxidative stress in the heart // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – V. 2017. – P. 9456163.
128. Karoui H., Chalier F., Finet J. P., Tordo P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water // *Org Biomol Chem.* – 2011. – V. 9. – №. 7. – P. 2473-2480.
129. Karoui H., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. Effect of superoxide dismutase mimics on radical adduct formation during the reaction between peroxynitrite and thiols-- an ESR-spin trapping study // *Arch Biochem Biophys.* – 1996. – V. 330, № 1. – P. 115-124.

130. Katsarou A., Pantopoulos K. Basics and principles of cellular and systemic iron homeostasis // *Mol Aspects Med.* – 2020. – V. 75. – P. 100866.
131. Keceli G., Majumdar A., Thorpe C. N., Jun S., Tocchetti C. G., Lee D. I., Mahaney J. E., Paolucci N., Toscano J. P. Nitroxyl (HNO) targets phospholamban cysteines 41 and 46 to enhance cardiac function // *J Gen Physiol.* – 2019. – V. 151, № 6. – P. 758-770.
132. Keszler A., Diers A. R., Ding Z., Hogg N. Thiolate-based dinitrosyl iron complexes: Decomposition and detection and differentiation from *S*-nitrosothiols // *Nitric Oxide.* – 2017. – V. 65. – P. 1-9.
133. Khan M. A., Dixit K., Moinuddin, Arif Z., Alam K. Studies on peroxynitrite-modified H1 histone: implications in systemic lupus erythematosus // *Biochimie.* – 2014. – V. 97. – P. 104-113.
134. Kim J., Jeong I. H., Kim C. S., Lee Y. M., Kim J. M., Kim J. S. Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking // *Arch Pharm Res.* – 2011. – V. 34, № 3. – P. 495-500.
135. Kirkwood T. B. Understanding the odd science of aging // *Cell.* – 2005. – V. 120, № 4. – P. 437-47.
136. Kirsch M., de Groot H. Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277, №.16. – P.13379 - 13388.
137. Kobayashi J., Murata I. Nitrite as a pharmacological intervention for the successful treatment of crush syndrome // *Physiol Rep.* – 2018. – V. 6, № 5. – e13633.
138. Kong X., Ma M. Z., Huang K., Qin L., Zhang H. M., Yang Z., Li X. Y., Su Q. Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2 // *J Diabetes.* – 2014. – V. 6, № 6. – P. 535-540.
139. Korithoski B., Levesque C. M., Cvitkovitch D. G. Involvement of the detoxifying enzyme lactoylglutathione lyase in *Streptococcus mutans* aciduricity // *J Bacteriol.* – 2007. – V. 189. – P. 7586-7592.
140. Korkina O. V., Ruuge E. K. Generation of superoxide radicals by heart mitochondria: study by spin trapping under continuous oxygenation // *Biofizika.* – 2000. – V. 45., №. 4. – P. 695-699.
141. Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Shumaev K. B., Novikova N. N., Topunov A. F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22, № 24. – P. 13649.
142. Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybullina E. I., Gubkina S. A., Topunov A. F. Interaction of *S*-nitrosoglutathione with methemoglobin under



conditions of modeling carbonyl stress // Hemoglobin. – 2013. – V. 37, № 3. – P. 205-218.

143. Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybullina E. I., Topunov A. F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction // Clin Chem Lab Med. – 2014. – V. 52, № 1. – P. 161-168.

144. Kosmachevskaya O., Novikova N., Topunov A. Carbonyl stress in red blood cells and hemoglobin // Antioxidants. – 2021. – V. 10. – P. 253.

145. Kosmopoulos M., Drekolias D., Zavras P. D., Piperi C., Papavassiliou A. G. Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2019. – V. 1865, № 3. – P. 611-619.

146. Kovacs I., Lindermayr C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein *S*-nitrosylation // Front Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 137.

147. Krautwald M., Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? // Exp Gerontol. – 2010. – V. 45, № 10. – P. 744-751.

148. Kruszewski M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases // Acta Biochim Pol. – 2004. – V. 51, № 2. – P. 471-480.

149. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680-685.

150. Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges // Progress in Lipid Research. – 2007. – V. 46. – P. 244-282.

151. Lam M. A., Pattison D. I., Bottle S. E., Keddie D. J., Davies M. J. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals // Chem Res Toxicol. – 2008. – V. 21, № 11. – P. 2111-2119.

152. Lankin V. Z., Tikhaze A. K., Kapel'ko V. I., Shepel'kova G. S., Shumaev K. B., Panasenko O. M., Konovalova G. G., Belenkov Y. N. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress // Biochemistry (Mosc). – 2007. – V. 72, № 10. – P. 1081-1090.

153. Lankin V. Z., Tikhaze A. K., Melkumyants A. M. Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage // Antioxidants (Basel). – 2022. – V. 11, № 8. – P. 1565.

154. Lee C., Yim M. B., Chock P. B., Yim H. S., Kang S. O. Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, № 39. – P. 25272-25278.

155. Lewandowska H., Brzóska K., Meczyńska-Wielgosz S., Rumianek K., Wójciuk G., Kruszewski M. Dinitrosyl iron complexes-structure and biological functions // *Postepy Biochem.* – 2010. – V. 56, № 3. – P. 298-304.
156. Li Q., Li C., Mahtani H. K., Du J., Patel A. R., Lancaster J. R., Jr. Nitrosothiol formation and protection against Fenton chemistry by nitric oxide-induced dinitrosyliron complex formation from anoxia-initiated cellular chelatable iron increase // *J Biol Chem.* – 2014. – V. 289, № 29. – P. 19917-19927.
157. Lienhard G. E., Jencks W. P. Thiol addition to the carbonyl group. Equilibria and kinetics // *J Am Chem Soc.* – 1966. – V. 88, № 17. – P. 3982-3994.
158. Lima B., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. S-nitrosylation in cardiovascular signaling // *Circ Res.* – 2010. – V. 106, № 4. – P. 633-646.
159. Lin E. Q., Irvine J. C., Cao A. H., Alexander A. E., Love J. E., Patel R., McMullen J. R., Kaye D. M., Kemp-Harper B. K., Ritchie R. H. Nitroxyl (HNO) stimulates soluble guanylyl cyclase to suppress cardiomyocyte hypertrophy and superoxide generation // *PLoS One.* – 2012. – V. 7, № 4. – e34892.
160. Lin J. A., Wu C. H., Yen G. C. Perspective of advanced glycation end products on human health // *J Agric Food Chem.* – 2018. – V. 66, № 9. – P. 2065-2070.
161. Litvinova L., Atochin D.N., Fattakhov N., Vasilenko M., Zatulokin P., Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome // *Front. Physiol.* – 2015. – V. 6. DOI: 10.3389/fphys.2015.00020
162. Liu H., Colavitti R., Rovira, II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation // *Circ Res.* – 2005. – V. 97, № 10. – P. 967-974.
163. Liu T., Schroeder H. J., Wilson S. M., Terry M. H., Romero M., Longo L. D., Power G. G., Blood A. B. Local and systemic vasodilatory effects of low molecular weight S-nitrosothiols // *Free Radic Biol Med.* – 2016. – V. 91. – P. 215-223.
164. Liu T., Zhang M., Terry M. H., Schroeder H., Wilson S. M., Power G. G., Li Q., Tipple T. E., Borchardt D., Blood A. B. Hemodynamic effects of glutathione-liganded binuclear dinitrosyl iron complex: evidence for nitroxyl generation and modulation by plasma albumin // *Mol Pharmacol.* – 2018. – V. 93, № 5. – P. 427-437.
165. Lobysheva I.I., Serezhenkov V. A., Vanin A. F. Interaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands *in vitro* // *Biochemistry (Mosc).* – 1999. – V. 64, № 2. – P. 153-158.
166. Loidl-Stahlhofen A., Spiteller G. Alpha-hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation // *Biochim Biophys Acta.* – 1994. – V. 1211, № 2. – P. 156-160.
167. Lopez B. E., Shinyashiki M., Han T. H., Fukuto J. M. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO) // *Free Radic Biol Med.* – 2007. – V. 42, № 4. – P. 482-491.

168. López G. V., Blanco F., Hernández P., Ferreira A., Piro O. E., Batthyány C., González M., Rubbo H., Cerecetto H. Second generation of alpha-tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization // *Bioorg Med Chem.* – 2007. – V. 15, № 18. – P. 6262-6272.
169. Lu T. T., Wang Y. M., Hung C. H., Chiou S. J., Liaw W. F. Bioinorganic chemistry of the natural [Fe(NO)(2)] motif: evolution of a functional model for NO-related biomedical application and revolutionary development of a translational model // *Inorg Chem.* – 2018. – V. 57, № 20. – P. 12425-12443.
170. Luevano-Contreras C., Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging // *Nutrients.* – 2010. – V. 2, № 12. – P. 1247-1265.
171. Lv H., Shang P. The significance, trafficking and determination of labile iron in cytosol, mitochondria and lysosomes // *Metallomics.* – 2018. – V. 10, № 7. – P. 899-916.
172. Madej E., Folkes L. K., Wardman P., Czapski G., Goldstein S. Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – V. 44, № 12. – P. 2013-2018.
173. Maessen D. E., Stehouwer C. D., Schalkwijk C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases // *Clin Sci (Lond).* – 2015. – V. 128, № 12. – P. 839-861.
174. Malatkova P., Maser E., Wsol V. Human carbonyl reductases // *Curr Drug Metab.* – 2010. – V. 11, № 8. – P. 639-658.
175. Martusevich A. K., Solov'eva A. G., Peteriagin S. P., Davydiuk A. V. Influence of dinitrosyl iron complexes on blood metabolism in rats with thermal trauma // *Biofizika.* – 2014. – V. 59, № 6. – P. 1173-1179.
176. Martusevich A., Soloveva A., Dmitrochenkov A., Ezhevskaya A., Razumovsky A. The response of human erythrocytes to NO-stimulation // *Annual Research and Review in Biology.* – 2018. – V. 26. – P. 1-11.
177. Miranda K. M., Nagasawa H. T., Toscano J. P. Donors of HNO // *Curr Top Med Chem.* – 2005. – V. 5, № 7. – P. 649-664.
178. Miranda K. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology // *Coordination Chemistry Reviews.* – 2005. – V. 249. – P. 433-455.
179. Mironova R., Niwa T., Hayashi H., Dimitrova R., Ivanov I. Evidence for non-enzymatic glycosylation in *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.* – 2001. – V. 39, № 4. – P. 1061-1068.
180. Mishra D., Patel V., Banerjee D. Nitric oxide and S-nitrosylation in cancers: emphasis on breast cancer // *Breast Cancer (Auckl).* – 2020. – V. 14. DOI: 10.1177/1178223419882688

181. Mitsumoto A., Kim K. R., Oshima G., Kunimoto M., Okawa K., Iwamatsu A., Nakagawa Y. Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione // *J Biochem.* – 2000. – V. 128, № 4. – P. 647-654.
182. Mnatsakanyan R., Markoutsas S., Walbrunn K., Roos A., Verhelst S. H. L., Zahedi R. P. Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique // *Nat Commun.* – 2019. – V. 10, № 1. – P. 2195.
183. Moncada S., Higgs E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance // *Eur J Clin Invest.* – 1991. – V. 21, № 4. – P. 361-374.
184. Muller F. L., Liu Y., Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 49064-49073.
185. Muronetz V. I., Melnikova A. K., Barinova K. V., Schmalhausen E. V. Inhibitors of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and unexpected effects of its reduced activity // *Biochemistry.* – 2019. – V. 84. – P. 1268-1279.
186. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochem J.* – 2009. – V. 417. – P. 1-13.
187. Nagababu E., Rifkind J. M. Heme degradation by reactive oxygen species // *Antioxid Redox Signal.* – 2004. – V. 6, № 6. – P. 967-978.
188. Nagai R., Mera K., Nakajou K., Fujiwara Y., Iwao Y., Imai H., Murata T., Otagiri M. The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – V. 1772, № 11-12. – P. 1192-1198.
189. Nagai R., Murray D. B., Metz T. O., Baynes J. W. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications // *Diabetes.* – 2012. – V. 61, № 3. – P. 549-559.
190. Navarro M., Morales F. J. Mechanism of reactive carbonyl species trapping by hydroxytyrosol under simulated physiological conditions // *Food Chem.* – 2015. – V. 175. – P. 92-99.
191. Nelli S., Craig J., Martin W. Oxidation by trace Cu<sup>2+</sup> ions underlies the ability of ascorbate to induce vascular dysfunction in the rat perfused mesentery // *European journal of pharmacology.* – 2009. – V. 614. – P. 84-90.
192. Nokin M. J., Durieux F., Bellier J., Peulen O., Uchida K., Spiegel D. A., Cochrane J. R., Hutton C. A., Castronovo V., Bellahcène A. Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7, № 1. – P. 11722.

193. Nyström T., Neidhardt F. C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest // *Mol Microbiol.* – 1994. – V. 11, № 3. – P. 537-544.
194. Odetti P., Pesce C., Traverso N., Menini S., Maineri E. P., Cosso L., Valentini S., Patriarca S., Cottalasso D., Marinari U. M., Pronzato M. A. Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes // *Diabetes.* – 2003. – V. 52, № 2. – P. 499-505.
195. Olson A. S., Jameson A. J., Kyasa S. K., Evans B. W., Dussault P. H. Reductive cleavage of organic peroxides by iron salts and thiols // *ACS Omega.* – 2018. – V. 3, № 10. – P. 14054-14063.
196. Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling // *Redox Biol.* – 2014. – V. 2. – P. 411-429.
197. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol Rev.* – 2007. – V.87, №1. – P. 315-424.
198. Park C. H., Xu F. H., Roh S. S., Song Y. O., Uebaba K., Noh J. S., Yokozawa T. Astaxanthin and Corni Fructus protect against diabetes-induced oxidative stress, inflammation, and advanced glycation end product in livers of streptozotocin-induced diabetic rats // *J Med Food.* – 2015. – V. 18, № 3. – P. 337-344.
199. Patel R. P., Hogg N., Kim-Shapiro D. B. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow // *Cardiovasc Res.* – 2011. – V. 89, № 3. – P. 507-515.
200. Peixoto Á S., Geyer R. R., Iqbal A., Truzzi D. R., Soares Moretti A. I., Laurindo F. R. M., Augusto O. Peroxynitrite preferentially oxidizes the dithiol redox motifs of protein-disulfide isomerase // *J Biol Chem.* – 2018. – V. 293, № 4. – P. 1450-1465.
201. Pepper E. Mechanisms of long-term survival in *Escherichia coli*. / A dissertation presented to University of Southern California. For the degree doctor of philosophy (molecular biology). 2007.
202. Pereira J. C., Iretskii A. V., Han R. M., Ford P. C. Dinitrosyl iron complexes with cysteine. Kinetics studies of the formation and reactions of DNICs in aqueous solution // *J Am Chem Soc.* – 2015. – V. 137, № 1. – P. 328-336.
203. Phillips S. A., Thornalley P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal // *Eur J Biochem.* – 1993. – V. 212, № 1. – P. 101-105.
204. Philpott C. C., Patel S. J., Protchenko O. Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2020. – V. 1867, № 11. – P. 118830.

205. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion // *Pflugers Arch.* – 2019. – V. 471, № 4. – P. 583-593.
206. Poulsen M. W., Hedegaard R. V., Andersen J. M., de Courten B., Bügel S., Nielsen J., Skibsted L. H., Dragsted L. O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health // *Food Chem Toxicol.* – 2013. – V. 60. – P. 10-37.
207. Prolo C., Álvarez M. N., Ríos N., Peluffo G., Radi R., Romero N. Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – V. 87. – P. 346-355.
208. Prus E., Fibach E. Effect of iron chelators on labile iron and oxidative status of thalassaemic erythroid cells // *Acta Haematol.* – 2010. – V. 123, № 1. – P. 14-20.
209. Rabbani N., Thornalley P. J. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress // *Biochem Soc Trans.* – 2008. – V. 36, № Pt 5. – P. 1045-1050.
210. Rabbani N., Thornalley P. J. Glycation research in amino acids: a place to call home // *Amino Acids.* – 2012. – V. 42. – P. 1087-1096.
211. Rabbani N., Xue M., Thornalley P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics // *Glycoconj J.* – 2016. – V. 33, № 4. – P. 513-525.
212. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288, № 37. – P. 26464-26472.
213. Radu B. M., Dumitrescu D. I., Mustaciosu C. C., Radu M. Dual effect of methylglyoxal on the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and neurite outgrowth in mouse sensory neurons // *Cell Mol Neurobiol.* – 2012. – V. 32, № 6. – P. 1047-1057.
214. Reeder B. J. Redox and peroxidase activities of the hemoglobin superfamily: relevance to health and disease // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – V. 26, № 14. – P. 763-776.
215. Reeder B. J., Svistunenko D. A., Cooper C. E., Wilson M. T. The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology // *Antioxid Redox Signal.* – 2004. – V. 6, № 6. – P. 954-966.
216. Reisz J. A., Bechtold E., King S. B. Oxidative heme protein-mediated nitroxyl (HNO) generation // *Dalton Trans.* – 2010. – V. 39, № 22. – P. 5203-5212.
217. Remizova M. I., Kochetygov N. I., Gerbout K. A., Lakomkin V. L., Timoshin A. A., Burgova E. N., Vanin A. F. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment // *Eur J Pharmacol.* – 2011. – V. 662, № 1-3. – P. 40-46.

218. Ricciardolo F. L. M., Sterk P. J., Gaston B., Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system // *Physiol Rev.* – 2004. – V. 84. – P. 731-765.
219. Ridnour L. A., Thomas D. D., Mancardi D., Espey M. G., Miranda K. M., Paolocci N., Feelisch M., Fukuto J., Wink D. A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations // *Biol Chem.* – 2004. – V. 385, № 1. – P. 1-10.
220. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates // *Methods Enzymol.* – 1981. – V. 76. – P. 5-29.
221. Rosca M. G., Mustata T. G., Kinter M. T., Ozdemir A. M., Kern T. S., Szveda L. I., Brownlee M., Monnier V. M., Weiss M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2005. – V. 289, № 2. – P. 420-430.
222. Rotta J. C. G., Lunardi C. N., Tedesco A. C. Nitric oxide release from the S-nitrosothiol zinc phthalocyanine complex by flash photolysis // *Braz J Med Biol. Res.* – 2003. – V. 36. – P. 587-594.
223. Sajithlal G. B., Chithra P., Chandrakasan G. An in vitro study on the role of metal catalyzed oxidation in glycation and crosslinking of collagen // *Mol Cell Biochem.* – 1999. – V. 194, № 1-2. – P. 257-263.
224. Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols // *Analyst.* – 1958. – V. 83, № 993. – P. 670-672.
225. Sawa T., Zaki M. H., Okamoto T., Akuta T., Tokutomi Y., Kim-Mitsuyama S., Ihara H., Kobayashi A., Yamamoto M., Fujii S., Arimoto H., Akaike T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate // *Nat Chem Biol.* – 2007. – V. 3, № 11. – P. 727-735.
226. Schalkwijk C. G., Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics // *Amino Acids.* – 2012. – V. 42, № 4. – P. 1193-204.
227. Schieber M., Chandel N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr Biol.* – 2014. – V. 24, № 10. – P. 453-462.
228. Schmorak J., Lewin M. The determination of small concentrations of carbonyl groups in starch by the cyanohydrin method // *Anal Chem.* – 1961. – V. 33, № 10. – P. 1403-1405.
229. Schnepfensieper T., Wanat A., Stochel G., van Eldik R. Mechanistic information on the reversible binding of NO to selected iron(II) chelates from activation parameters // *Inorg Chem.* – 2002. – V. 41, № 9. – P. 2565-2573.
230. Schopfer F. J., Cipollina C., Freeman B. A. Formation and signaling actions of electrophilic lipids // *Chem Rev.* – 2011. – V. 111, № 10. – P. 5997-6021.

231. Selemidis S., Dusting G.J., Peshavariya H., Kemp-Harper B.K., Drummond G.R. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells // *Cardiovasc Res.* – 2007. – V. 15, №2. – P. 349-358.
232. Sell D. R., Nagaraj R. H., Grandhee S. K., Odetti P., Lapolla A., Fogarty J., Monnier V. M. Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia // *Diabetes Metab Rev.* – 1991. – V. 7, № 4. – P. 239-251.
233. Sergent O., Griffon B., Morel I., Chevanne M., Dubos M. P., Cillard P., Cillard J. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture // *Hepatology.* – 1997. – V. 25, № 1. – P. 122-127.
234. Shabalala S. C., Johnson R., Basson A. K., Ziqubu K., Hlengwa N., Mthembu S. X. H., Mabhida S. E., Mazibuko-Mbeje S. E., Hanser S., Cirilli I., Tiano L., Dlodla P. V. Detrimental effects of lipid peroxidation in type 2 diabetes: exploring the neutralizing influence of antioxidants // *Antioxidants (Basel).* – 2022. – V. 11, № 10.
235. Shadyro O., Samovich S., Edimecheva I. Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – V. 144. – P. 6-15.
236. Shafirovich V., Lyamar S. V. Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – V. 99, № 11. – P. 7340-7345.
237. Shamova E. V., Bichan O. D., Drozd E. S., Gorudko I. V., Chizhik S. A., Shumaev K. B., Cherenkevich S. N., Vanin A. F. Regulation of the functional and mechanical properties of platelet and red blood cells by nitric oxide donors // *Biofizika.* – 2011. – V. 56, № 2. – P. 265-271.
238. Shin M. G., Lee J. W., Han J. S., Lee B., Jeong J. H., Park S. H., Kim J. H., Jang S., Park M., Kim S. Y., Kim S., Yang Y. R., Kim J. Y., Hoe K. L., Park C., Lee K. P., Kwon K. S., Kwon E. S. Bacteria-derived metabolite, methylglyoxal, modulates the longevity of *C. elegans* through TORC2/SGK-1/DAF-16 signaling // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – V. 117, № 29. – P. 17142-17150.
239. Shiva S., Crawford J. H., Ramachandran A., Ceaser E. K., Hillson T., Brookes P. S., Patel R. P., Darley-Usmar V. M. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria // *Biochem J.* – 2004. – V. 379. – P. 359-366.
240. Shoman M. E., Aly O. M. Nitroxyl (HNO): a reduced form of nitric oxide with distinct chemical, pharmacological, and therapeutic properties // *Oxid Med Cel Longev.* – 2016. – V. 2016.



241. Shumaev K. B., Dudylina A. L., Ivanova M. V., Pugachenko I. S., Ruuge E. K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // *Biofactors*. – 2018. – V. 44, № 3. – P. 237-244.
242. Shumaev K. B., Gorudko I. V., Kosmachevskaya O. V., Grigorieva D. V., Panasenko O. M., Vanin A. F., Topunov A. F., Terekhova M. S., Sokolov A. V., Cherenkevich S. N., Ruuge E. K. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid // *Oxid Med Cell Longev*. – 2019. – V. 2019. – P. 2798154.
243. Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobysheva, II, Kosmachevskaya O. V., Ruuge E. K., Lankin V. Z., Topunov A. F., Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // *Nitric Oxide*. – 2008. – V. 18, № 1. – P. 37-46.
244. Shumaev K. B., Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Gromov S. V., Novikov A. A., Topunov A. F. New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine // *J Biol Inorg Chem*. – 2017. – V. 22, № 1. – P. 153-160.
245. Shumaev K. B., Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Ruuge E. K., Topunov A. F. Role of nitric oxide-derived metabolites in reactions of methylglyoxal with lysine and lysine-rich protein leghemoglobin // *Int J Mol Sci*. – 2023. – V. 24, № 1. – e168.
246. Shumaev K. B., Kosmachevskaya O. V., Timoshin A. A., Vanin A. F., and Topunov A. F. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 2008. – V. 436. – P. 445-461.
247. Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Konorev E., Kalyanaraman B. The peroxyxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors // *Arch Biochem Biophys*. – 1999. – V. 361, № 2. – P. 331-339.
248. Smulik R., Dębski D., Zielonka J., Michałowski B., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A. Nitroxyl (HNO) reacts with molecular oxygen and forms peroxyxynitrite at physiological pH. Biological Implications // *J Biol Chem*. – 2014. – V. 289, № 51. – P. 35570-35581.
249. Smulik-Izydorczyk R., Dębowska K., Rostkowski M., Adamus J., Michalski R., Sikora A. Kinetics of azanone (HNO) reactions with thiols: effect of pH // *Cell Biochem Biophys*. – 2021. – V. 79, № 4. – P. 845-856.
250. Sobko T., Reinders C.I., Jansson E., Norin E., Midtvedt T., Lundberg J.O. Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite // *Nitric Oxide*. – 2005. – V. 13. – P. 272-278.

251. Song Q., Liu J., Dong L., Wang X., Zhang X. Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – V. 140. – P. 111750.
252. Speelman A. L., Zhang B., Silakov A., Skodje K. M., Alp E. E., Zhao J., Hu M. Y., Kim E., Krebs C., Lehnert N. Unusual synthetic pathway for an {Fe(NO)<sub>2</sub>}(9) dinitrosyl iron complex (DNIC) and insight into DNIC electronic structure via nuclear resonance vibrational spectroscopy // *Inorg Chem.* – 2016. – V. 55, № 11. – P. 5485-5501.
253. Stief T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen // *Med Hypoth.* – 2003. – V. 60. – P. 567-572.
254. Stocker R., Keaney Jr. J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis // *Physiol Rev.* – 2004. – V. 84. – P. 1381-1478.
255. Stomberski C. T., Hess D. T., Stamler J. S. Protein S-nitrosylation: determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling // *Antioxid Redox Signal.* – 2019. – V. 30, № 10. – P. 1331-1351.
256. Suarez S. A., Muñoz M., Alvarez L., Venâncio M. F., Rocha W. R., Bikiel D. E., Marti M. A., Doctorovich F. HNO is produced by the reaction of NO with thiols // *J Am Chem Soc.* – 2017. – V. 139, № 41. – P. 14483-14487.
257. Suarez S. A., Neuman N. I., Muñoz M., Álvarez L., Bikiel D. E., Brondino C. D., Ivanović-Burmazović I., Miljkovic J., Filipovic M. R., Martí M. A., Doctorovich F. Nitric oxide is reduced to HNO by proton-coupled nucleophilic attack by ascorbate, tyrosine, and other alcohols. A new route to HNO in biological media? // *J Am Chem Soc.* – 2015. – V. 137, № 14. – P. 4720-4727.
258. Sun H., Lee W., Leng B., Wu Z., Yang Y., Bian J. Nitroxyl as a potential theranostic in the cancer arena // *Antioxid Red Signal.* – 2020. – V. 32. – P. 331-349.
259. Svistunenko D. A. Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – V. 1707, № 1. – P. 127-155.
260. Svistunenko D. A., Dunne J., Fryer M., Nicholls P., Reeder B. J., Wilson M. T., Bigotti M. G., Cutruzzolà F., Cooper C. E. Comparative study of tyrosine radicals in hemoglobin and myoglobins treated with hydrogen peroxide // *Biophys J.* – 2002. – V. 83, № 5. – P. 2845-2855.
261. Switzer C. H., Flores-Santana W., Mancardi D., Donzelli S., Basudhar D., Ridnour L. A., Miranda K. M., Fukuto J. M., Paolocci N., Wink D. A. The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V. 1787. – P. 835-840.

262. Taguchi K., Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer // *Front Oncol.* – 2017. – V. 7. – P. 85.
263. Thomas C. E., Morehouse L. A., Aust S. D. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation // *J Biol Chem.* – 1985. – V. 260, № 6. – P. 3275-3280.
264. Thomas D. D., Corey C., Hickok J., Wang Y., Shiva S. Differential mitochondrial dinitrosyliron complex formation by nitrite and nitric oxide // *Redox Biol.* – 2018. – V. 15. – P. 277-283.
265. Thornalley P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts // *Arch Biochem Biophys.* – 2003. – V. 419, № 1. – P. 31-40.
266. Thornalley P. J., Hooper N. I., Jennings P. E., Florkowski C. M., Jones A. F., Lunec J., Barnett A. H. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus // *Diabetes Res Clin Pract.* – 1989. – V. 7, № 2. – P. 115-120.
267. Thornalley P. J., Langborg A., Minhas H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose // *Biochem J.* – 1999. – V. 344, Pt 1(Pt 1). – P. 109-116.
268. Thornalley P. J., Yurek-George A., Argirov O. K. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions // *Biochem Pharmacol.* – 2000. – V. 60, № 1. – P. 55-65.
269. Tien M., Bucher J. R., Aust S. D. Thiol-dependent lipid peroxidation // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1982. – V. 107, № 1. – P. 279-285.
270. Tikhaze A. K., Kosach V. Y., Lankin V. Z., Panferova A. A., Smirnova M. D. Indicator characterizing carbonyl-dependent modification of erythrocytic superoxydismutase as a biochemical marker of oxidative stress in coronary heart disease // *Kardiologiya.* – 2020. – V. 60, № 5. – P. 1019.
271. Tiso M., Schechter A. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions // *PLoS one.* – 2015. – V. 10. – №3 – e0019712.
272. Toledo J. C., Jr., Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide // *Chem Res Toxicol.* – 2012. – V. 25, № 5. – P. 975-989.
273. Toledo J. C., Jr., Bosworth C. A., Hennon S. W., Mahtani H. A., Bergonia H. A., Lancaster J. R., Jr. Nitric oxide-induced conversion of cellular chelatable iron into macromolecule-bound paramagnetic dinitrosyliron complexes // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283, № 43. – P. 28926-28933.
274. Tran N. G., Kalyvas H., Skodje K. M., Hayashi T., Moënné-Loccoz P., Callan P. E., Shearer J., Kirschenbaum L. J., Kim E. Phenol nitration induced by an

- {Fe(NO)<sub>2</sub>}(10) dinitrosyl iron complex // *J Am Chem Soc.* – 2011. – V. 133, № 5. – P. 1184-1187.
275. Trnkova L., Drsata J., Bousova I. Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction // *J Biosci.* – 2015. – V. 40, № 2. – P. 419-439.
276. Trostchansky A., Rubbo H. Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – V. 44. – P. 1887-1896.
277. Trujillo M., Alvarez M. N., Peluffo G., Freeman B. A., Radi R. Xanthine Oxidase-mediated Decomposition of *S*-Nitrosothiols // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – №. 14. – P. 7828-7834.
278. Trujillo M., Naviliat M., Alvarez M.N., Peluffo G., Radi R. Peroxynitrite biochemistry: formation, reactions and detection // *Analisis.* – 2000. – V. 28. – № 6. – P. 518-527.
279. Truzzi D. R., Alves S. V., Netto L. E. S., Augusto O. The peroxidatic thiol of peroxiredoxin 1 is nitrosated by nitrosoglutathione but coordinates to the dinitrosyl iron complex of glutathione // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – V. 9, № 4. – P. 276.
280. Truzzi D. R., Augusto O., Ford P. C. Thiyl radicals are co-products of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation // *Chem Commun (Camb).* – 2019. – V. 55, № 62. – P. 9156-9159.
281. Truzzi D. R., Augusto O., Iretskii A. V., Ford P. C. Dynamics of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation with low molecular weight thiols // *Inorg Chem.* – 2019. – V. 58, № 19. – P. 13446-13456.
282. Truzzi D. R., Medeiros N. M., Augusto O., Ford P. C. Dinitrosyl iron complexes (DNICs). From spontaneous assembly to biological roles // *Inorg Chem.* – 2021. – V. 60, № 21. – P. 15835-15845.
283. Tsai M. L., Tsou C. C., Liaw W. F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): from biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs // *Acc Chem Res.* – 2015. – V. 48, № 4. – P. 1184-1193.
284. Uribarri J., Woodruff S., Goodman S., Cai W., Chen X., Pyzik R., Yong A., Striker G. E., Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet // *J Am Diet Assoc.* – 2010. – V. 110, № 6. – P. 911.
285. Van der Vliet A., Chr.'t Hoen P. A., Wong P. S., Bast A., Cross C. E. Formation of *S*-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 30255-30262.

286. Vander Jagt D. L., Hunsaker L. A., Campos N. M., Baack B. R. D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* // *Mol Biochem Parasitol.* – 1990. – V. 42, № 2. – P. 277-284.
287. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // *Nitric Oxide.* – 2009. – V. 21, № 1. – P. 1-13.
288. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working form" of endogenous nitric oxide // *Nitric Oxide.* – 2016. – V. 54. – P. 15-29.
289. Vanin A. F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22, № 19. – P. 10356.
290. Vanin A. F. Positive (regulatory) and negative (cytotoxic) effects of dinitrosyl iron complexes on living organisms // *Biochemistry (Mosc).* – 2022. – V. 87, № 11. – P. 1367-1386.
291. Vanin A. F., Mokh V. P., Serezhenkov V. A., Chazov E. I. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands // *Nitric Oxide.* – 2007. – V. 16, № 3. – P. 322-330.
292. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies // *Nitric Oxide.* – 2010. – V. 23, № 2. – P. 136-149.
293. Vanin A. F., van Faassen E // In: *Radicals for life. The various forms of nitric oxid.* – 2007. – P. 383-405.
294. Vanin A. The free-radical nature of nitric oxide molecules as a determinant of their conversion to nitrosonium cations in living systems // *Biophysics.* – 2020. – V. 65. – P. 353-367.
295. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes as a "working form" of nitric oxide in living. // Cambridge Scholars Publishing. – 2019. – 276 p.
296. Vasilieva S. V., Petrishcheva M. S., Yashkina E. I., Osipov A. N. Signaling and physiological activity of the NO-donating agent TNICthio in human blood lymphocytes, Jurkat and MCF7 cell lines // *Mol Biol Rep.* – 2019. – V. 46, № 1. – P. 719-725.
297. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M. C. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275, № 19. – P. 14064-14069.
298. Venkataraman S., Schafer F. Q., Buettner G. R. Detection of lipid radicals using EPR // *Antiox Redox Signal.* – 2004. – V. 6., №3. – P. 631-638.

299. Villa M., Parravano M., Micheli A., Gaddini L., Matteucci A., Mallozzi C., Facchiano F., Malchiodi-Albedi F., Pricci F. A quick, simple method for detecting circulating fluorescent advanced glycation end-products: Correlation with in vitro and in vivo non-enzymatic glycation // *Metabolism*. – 2017. – V. 71. – P. 64-69.
300. Vlasova I. I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control // *Molecules*. – 2018. – V. 23, № 10. – P. 2561.
301. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2001. – V. 17, № 6. – P. 436-443.
302. Vlassara H., Striker G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift // *Nat Rev Endocrinol*. – 2011. – V. 7, № 9. – P. 526-539.
303. Wajih N., Liu X., Shetty P., Basu S., Wu H., Hogg N., Patel R. P., Furdui C. M., Kim-Shapiro D. B. The role of red blood cell *S*-nitrosation in nitrite bioactivation and its modulation by leucine and glucose // *Redox Biol*. – 2016. – V. 8. – P. 415-421.
304. Wang H., Liu J., Wu L. Methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells // *Biochem Pharmacol*. – 2009. – V. 77, № 11. – P. 1709-1716.
305. Wang P. G., Xian M., Tang X., Wu X., Wen Z., Cai T., Janczuk A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications // *Chem Rev*. – 2002. – V. 102. – P. 1091-1134.
306. Weber J., Kayser A., Rinas U. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activation of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour // *Microbiology* – 2005. – V. 151 – P. 707-716.
307. Wink D. A., Hanbauer I., Krishna M. C., DeGraff W., Gamson J., Mitchell J. B. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – V. 90. – P. 9813-9817.
308. Wink D. A., Mitchell J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide // *Free Radic Biol Med*. – 1998. – V. 25, № 4/5. – P. 434-456.
309. Wong A., Dukic-Stefanovic S., Gasic-Milenkovic J., Schinzel R., Wiesinger H., Riederer P., Münch G. Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia // *Eur J Neurosci*. – 2001. – V. 14, № 12. – P. 1961-1967.
310. Wrobel A. T., Johnstone T. C., Deliz Liang A., Lippard S. J., Rivera-Fuentes P. A fast and selective near-infrared fluorescent sensor for multicolor imaging of biological nitroxyl (HNO) // *J Am Chem Soc*. – 2014. – V. 136, № 12. – P. 4697-4705.

311. Yan J., Huang X., Zhu D., Lou Y. Enhanced aerobic glycolysis by S-nitrosoglutathione via HIF-1 $\alpha$  associated GLUT1/Aldolase a axis in human endothelial cells // J Cell Biochem. – 2017. – V. 118, № 8. – P. 2443-2453.
312. Yim H. S., Kang S. O., Hah Y. C., Chock P. B., Yim M. B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals // J Biol Chem. – 1995. – V. 270, № 47. – P. 28228-28233.
313. Yoon J. H., Lee M. S., Kang J. H. Reaction of ferritin with hydrogen peroxide induces lipid peroxidation // BMB Rep. – 2010. – V. 43, № 3. – P. 219-224.
314. Zeng J., Davies M. J. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins // Chem Res Toxicol. – 2005. – V. 18, № 8. – P. 1232-1241.
315. Ziemann S. J., Kass D. A. Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease // Drugs. – 2004. – V. 64, № 5. – P. 459-470.
316. Zhang M., Kho A. L., Anilkumar N., Chibber R., Pagano P. J., Shah A. M., Cave A. C. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase // Circulation. – 2006. – V. 113, № 9. – P. 1235-1243.
317. Zhang R., Hess D. T., Qian Z., Hausladen A., Fonseca F., Chaube R., Reynolds J. D., Stamler J. S. Hemoglobin  $\beta$ Cys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – V. 112, № 20. – P. 6425-6430.
318. Zhu M. M., Skraly F. A., Cameron D. C. Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene // Metab Eng. – 2001. – V. 13 – P. 218-225.
319. Абаленихина Ю. В., Фомина М. А. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимокитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II) // Казанский медицинский журн. 2014. – Т. 95., № 4. – С. 553-557.
320. Арцатбанов В. Ю., Галон И. А., Гончаренко А. В., Островский Д. Н. Нитроксильные соединения у бактерий. Поиск функций // Микробиология. – 2009. – Т. 10 – С. 605-611.
321. Бах А. Н. О роли перекисей в процессах медленного окисления // Журнал Российского физико-химического общества. – 1897. – Т. 29. – С. 373-398.

322. Бурлакова Е. Б., Крашаков С. А., Храпова Н. Г. Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15. – № 2. – С. 137-167.
323. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. / М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2015. – 220 с.
324. Ванин А. Ф., Телегина В. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А., Васильева С. В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов // Биофизика. – 2022. Т. 67., № 5. – С. 938-946.
325. Васильева С. В., Алексеева Н. В., Романова Ю. М., Ванин А. Ф. Катион нитрозония  $\text{NO}^+$  ингибирует функции оксида азота NO в регуляции роста биопленок *Pseudomonas aeruginosa* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2023. – Т. 41, № 1. – С. 32-37.
326. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И., Козлов А. В., Осипов А. Н., Ращупкин Д. И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 252.
327. Космачевская О. В., Насыбуллина Э. И., Шумаев К. Б., Новикова Н. Н., Топунов А. Ф. Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина // Прикл. биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – С. 436-445.
328. Космачевская О. В., Насыбуллина Э. С., Шумаев К. Б., Чумикина Л. В., Арабова Л. И., Яглова Н. В., Обернихин С. С., Топунов А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации // Прикл. биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57. – С. 315-325.
329. Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Образование гликированного рекомбинантного легоглобина в клетках *Escherichia coli*. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 324-330.
330. Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Неферментативные реакции в метаболизме: роль в эволюции и адаптации // Прикл. биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57, № 5. – С. 417-431.
331. Космачевская О. В., Шумаев К. Б., Топунов А. Ф. Карбонильный стресс у бактерий: причины и последствия. // Успехи биологической химии. – 2015. – Т. 55. – С. 49-82.
332. Космачевская О. В., Шумаев К. Б., Топунов А. Ф. Карбонильный стресс: от бактерий до человека. / Петрозаводск: ИП Марков Н.А. – 2018. – 255 с.



333. Космачевская О. В., Шумаев К. Б., Топунов А. Ф. Сигнальное и регуляторное действие метилглиоксаля в эукариотических клетках // Прикл. биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53., №3. – С. 253-270.
334. Космачевская О. В., Шумаев К. Б., Топунов А. Ф. Электрофильная сигнализация: роль активных карбонильных соединений // Успехи биологической химии. – 2019. – Т. 59. – С. 419-454.
335. Красновский А. А. Синглетный молекулярный кислород: механизмы образования и пути дезактивации в фотосинтетических системах // Биофизика. – 1994. – Т. 39., Вып. 2. – С. 236-250.
336. Кулева Н. В., Красовская И. Е. Новая роль миоглобина в функционировании сердечной и скелетных мышц // Биофизика. – 2016. – Т. 61., № 5. – С. 861-864.
337. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. – 2000. – Т. 40., № 7. – С. 48-61.
338. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях // М.: РКНПК МЗ РФ. – 2001. – С. 78.
339. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфанкин В. А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты // М.: Фирма «Слово». – 2006. – С. 553.
340. Микоян В. Д., Кубрина Л. Н., Хачатрян Г. Н., Ванин А. Ф. Протонирование нитрита – необходимая стадия в процессе генерации оксида азота из нитрита в биосистемах // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 6. – С. 968-975.
341. Омельчук С. Т., Великая Н. В., Залесский В. Н. Механизмы детоксикации ксенобиотиков: поддержка баланса детоксикации компонентами продуктов питания растительного происхождения // Оригинальные исследования (Киев). – 2015. – № 1. – С. 23-37.
342. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н. С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих // М.: Наука. – 1998. – 159 с.
343. Родненков О. В., Зорин А. В., Гостеев А. Ю., Драгнев А. Г., Чазов Е. И. Эффективность и безопасность нового гипотензивного препарата «Оксаком» - результаты 1-й и 2-й фазы клинических испытаний // Евразийский Кардиологический Журнал. – 2016. – № 3. – С. 186-187.
344. Семенов Н. Н. Цепные реакции. // М.: Наука, 1986, 534 с.
345. Скулачев В. П., Скулачев М. В., Фенюк Б. А. Жизнь без старости // М.: Эксмо. – 2014. – 256 с.

346. Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения // М.: Госатомиздат. – 1962. – 96 с.
347. Трубицин Б. В., Кокшаров Ю. А., Шаталов Н. А., Рууге Э. К., Тихонов А. Н. Модернизация спектрометров ЭПР: компьютеризированное управление блоком развертки магнитного поля, повышение точности регистрации и компьютерной обработки сигналов ЭПР // В сб.: X Международная конференция «Магнитный резонанс в химии и биологии» (Суздаль). – 1998. – С. 9-10.
348. Шумаев К. Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов / Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук // М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. – 2010. – 332 с.
349. Шумаев К. Б., Губкина С. А., Кумскова Е. М., Шепелькова Г. С., Рууге Э. К., Ланкин В. З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии *L*-лизина с дикарбонильными соединениями // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 4. – С. 568-574.
350. Шумаев К. Б., Космачевская О. В., Топунов А. Ф., Насыбуллина Э. И., Мартусевич А. К., Рууге Э. К. Влияние различных доноров оксида азота на ферментативное гликирование биомолекул // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2021. – Т. 6, № 3. – С. 494-497.
351. Шумаев К. Б., Петрова Н. Э., Заббарова И. В., Ванин А. Ф., Топунов А. Ф., Ланкин В. З., Рууге Э. К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 699-705.
352. Шумаев К. Б., Рууге Э. К., Ланкин В. З., Ванин А. Ф., Гомбоева С. Б., Беленков Ю. Н. Механизм ингибирования свободнорадикального окисления  $\beta$ -каротина *S*-нитрозоглутатионом и динитрозильными комплексами железа // Докл. РАН. – 2001. – Т. 379, № 5. – С. 702-704.