

*На правах рукописи*

Пугаченко Игорь Сергеевич

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

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук».

**Научный руководитель:** **Космачевская Ольга Владимировна**,  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
ФИЦ Биотехнологии РАН.

**Официальные оппоненты:** **Муронец Владимир Израилевич**,  
доктор биологических наук, профессор, зав. отделом  
биохимии животной клетки НИИ физико-химической  
биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.  
Ломоносова;

**Васильева Светлана Васильевна**,  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник  
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
РАН.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».

Защита состоится «29» февраля 2024 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «    »                      2023 года.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.1.233.01,  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 гипоазотистую 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 нитроксиле 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 № 18-34-00561мол\_a 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.

**Сокращения, принятые в тексте.** АФК – активные формы кислорода, АФА – активные формы азота, КПП – конечные продукты гликирования, ЛНП – липопротеиды низкой плотности, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ПОЛ – перекисное окисление липидов, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, БСА – бычий сывороточный альбумин, СОД – супероксиддисмутаза, Hb – гемоглобин, DEPMPO – 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид, ДТПА – диэтилентриаминопента-уксусная кислота, MG – метилглиоксаль, NO – оксид азота, GSH – восстановленный глутатион, LA – липоевая кислота, AS – соль Ангели, GSNO – нитрозоглутатион, AcCys-ДНКЖ/GS-ДНКЖ/ДНКЖ-PO<sub>4</sub> – динитрозильные комплексы железа с ацетилцистеиновыми лигандами/глутатионовыми лигандами/фосфатными лигандами, PAPA/NONO – 3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин, МТТ – дифенилтетразолий бромид, *t*-BOOH – гидропероксид *трет*-бутила.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает три раздела. В первом разделе описаны основные пути образования активных форм кислорода и азота, а также последствия окислительного стресса для организма. Второй раздел посвящен описанию образования, химических свойств и биологического действия метаболитов оксида азота. Основное внимание уделено динитрозильным комплексам железа и нитроксильному аниону. В третьем разделе обобщена информация о карбонильном стрессе. Описаны пути образования и детоксикации активных карбонильных соединений. Рассматривается взаимосвязь карбонильного стресса с окислительным.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Синтез S-нитрозотиолов, ДНКЖ и пероксинитрита.** S-нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозоцистеин синтезировали, смешивая в кислой среде эквимольные концентрации  $\text{NaNO}_2$  и восстановленного глутатиона или цистеина соответственно. ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ ) синтезировали, пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор  $\text{FeSO}_4$  (5 мМ) в 100 мМ фосфатном буфере (рН 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 рН смеси до 7,0 с помощью NEPES. Синтез ДНКЖ с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) проводили, добавляя ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  к раствору липоевой кислоты в изопропанол. Концентрацию ДНКЖ определяли методом ЭПР по интегральной интенсивности сигнала этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. Концентрацию нитрозотиолов и пероксинитрита определяли по поглощению при 338 и 302 нм соответственно.

**Токофероксильный радикал** получали путем окисления 0,1 М раствора токоферола ( $\alpha$ -ТОН) в  $\text{MnO}_2$ . Для очистки раствора от окисла марганца его пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрация токофероксильного радикала была ~70 мМ.

**Перекисное окисление в липосомах и мицеллах из жирных кислот** индуцировали гидрофобным азоинициатором – 2,2'-азобис(2-метилпропионитрилом) (AIBN), в ходе термоиндуцированной декомпозиции которого образуются алкоксильные и пероксильные радикалы [Laguerre, 2007].

**Липосомы из жирных кислот** получали, добавляя к 0,25 мл раствора яичного фосфатидилхолина в хлороформе (100 мг/мл) 3 мг AIBN. После испарения хлороформа в потоке газообразного азота к липидной пленке добавляли 2,3 мл фосфатного буфера (0,1 М; рН 7,4) и встряхивали в течение 5 минут. Полученную суспензию пропускали 15 раз через установку для получения липосом, оснащенную мембраной с размером пор 0,22 мкм.

**Мицеллы из жирных кислот** получали впрыскиванием этанольного раствора полиненасыщенных жирных кислот в фосфатный буфер и последующим интенсивным встряхиванием.

**Митохондрии** выделяли из сердца нормотензивных крыс линии Wistar. Эксперименты проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных и с предварительного одобрения Комитета по этике животных НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. Извлеченное из животных сердце помещали в среду выделения, измельчали и гомогенизировали. Полученные с помощью осаждения митохондрии суспендировали в среде выделения, содержащей БСА (3 мг/мл).

**Образование алкилпероксильных, алкоксильных и тиольных радикалов** регистрировали с использованием спиновой ловушки DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид) [Shumayev, 2004; Karoui, 2011].

**ЭПР спектроскопия.** Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E («Varian», США) при комнатной температуре (25°C) и на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 «КБСТ» БГУ (Беларусь). Для поддержания постоянного газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемый капилляр PTFE Sub-Lite-Wall.

**Окисление дигидрородамина пероксинитритом.** При распаде SIN-1 образуется пероксинитрит, который окисляет дигидрородамин в родамин. Родамин регистрировали по оптическому поглощению при 500 нм на спектрофотометре Cary 300 («VarianBio», США). Скорость окисления дигидрородамина оценивали по тангенсу угла наклона линейного участка кинетической кривой.

**Восстановленные тиоловые группы** измеряли с помощью соединения ThioGlo1 (3H-нафтол[2,1-b]пиран-s-карбоновая кислота), которое образует тиоловый аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 500 нм при длине волны возбуждения 379 нм. Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония)

**Неферментативно гликированный гемоглобин** получали при его инкубации с метилглиоксалем (MG) в присутствии или в отсутствие соли Ангели (донора нитроксила) в течение 1-4

суток при 37 °С. Непрореагировавший MG удаляли диализом. К раствору 0,15 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли 40% раствор MG до конечной концентрации 54 мМ. Соль Ангели в 10 мМ NaOH вносили до конечной концентрации 3,5 мМ.

**Степень гликирования гемоглобина** оценивали по флуоресценции связанных с белком КПП ( $\lambda_{\text{возб}} = 334$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 440$  нм) на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301-PC (Япония).

**SDS-электрофорез** проводили в блоках 12% ПААГ размером 150×150×1 мм по методу Лэммли [Laemmli, 1970].

**Гель-проникающую хроматографию гемоглобина** проводили на колонке (43×2,2 см) с носителем Toyperl HW-55F, уравновешенным 25 мМ Tris-HCl буфером (рН 7,5) с 0,2 М NaCl.

**Белковые карбонилы** измеряли, добавляя к 0,1 мл раствора белка 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ (2,4-динитрофенилгидразин) в 2 М HCl, и инкубировали в течение часа. Белок осаждали добавлением 0,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 10 минут образцы центрифугировали, белковый осадок трижды отмывали смесью этилового спирта и этилацетата (1:1). Полученный осадок подсушивали на воздухе и перед спектрофотометрическим измерением растворяли в 1 мл 8 М раствора мочевины.

**Содержание гемовой группы** в гемоглобине регистрировали с помощью пиридингемохромового метода [Riggs, 1981]. К 15 мкл раствора Hb добавляли 135 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. 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  $\epsilon_{556-539} = 4,3 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

#### **Оценка антиоксидантных/антирадикальных свойств нитроксила**

**Люминол-зависимая хемилюминесценция.** Регистрацию хемилюминесценции проводили на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия). Регистрацию начинали через 2-3 секунды после смешения компонентов реакционной смеси.

**Регистрация спиновых аддуктов DEPMPO со свободными радикалами.** Образование органических свободных радикалов в реакции metHb с *t*-BOOH регистрировали с помощью спектроскопии ЭПР со спиновой ловушкой DEPMPO (конечная концентрация 75 мМ). Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре через 5 минут после смешивания компонентов.

**Клетки *Escherichia coli* (штамм ТВ-1)** выращивали в жидкой среде LB в течение 15 часов при 37 °С на термошейкере до  $OD_{600} = 0,096$  ед. Полученную культуру использовали для засева серии колб объемом 350 мл, содержащих 60 или 150 мл жидкой среды LB. В начале логарифмической фазы роста вносили раствор MG до конечной концентрации 3 мМ и/или кислоту Пилоти (донор нитроксила) до конечной концентрации 1 мМ. Концентрацию клеток в культуре определяли по величине  $OD_{600}$ .

**Белковый экстракт из клеток *E. coli*** получали из 24-часовой бактериальной культуры. Клетки отмывали от компонентов питательной среды, после чего к суспензии клеток добавляли лизоцим (20 мкг/мл), инкубировали в течение часа и затем разрушали ультразвуком. Фракцию растворимых белков получали центрифугированием суспензии.

**Флуоресценцию растворимых белков из клеток *E. coli*** регистрировали при  $\lambda_{\text{возб}} = 325$  нм и  $\lambda_{\text{исп}} = 490$  нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5302 PC (Япония).

**Жизнеспособность клеток *E. coli*** оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого к 100 мкл 8-часовой бактериальной культуры в 0,4 мл среды LB добавляли 0,1 мкл МТТ (5 мг/мл) и инкубировали при 37 °С в течение часа. Образовавшиеся кристаллы формазана отделяли центрифугированием и растворяли в 0,5 мл изопропанола. Количество формазанов определяли по оптическому поглощению при 560 нм на спектрофотометре Cary 300 («VarianBio», США).

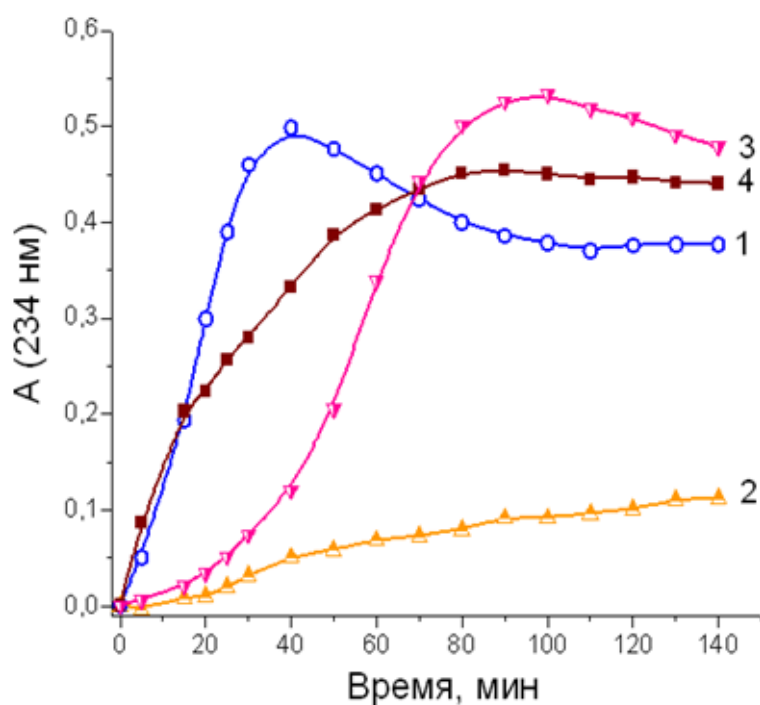
**Работы с использованием лабораторных животных** соответствовали Международным рекомендациям по биомедицинским исследованиям (CIOMS), Приказу Минздравсоцразвития России «Об утверждении правил лабораторной практики» (№708н от 23.08.2019) и другим нормативным документам по данной проблематике.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ 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

Патогенез многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, в первую очередь атеросклероза, связан с окислительной модификацией липопротеидов низкой плотности (ЛНП) [Ланкин, 2001; Shabalala et al., 2022]. В связи с этим в работе исследовалось влияние глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ) на перекисное окисление липидов в ЛНП, индуцированное ионами меди. Уровень окислительной модификации ЛНП оценивали по концентрации диеновых конъюгатов – продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), имеющих максимум оптического поглощения при 234 нм. ДНКЖ в концентрации 20 мкМ эффективно ингибируют перекисное окисление в ЛНП (рисунок 1). Разные типы ДНКЖ по-разному проявляли себя в процессах, имитирующих ПОЛ. Например, GS-ДНКЖ оказались существенно эффективнее, чем восстановленный глутатион (GSH) в той же концентрации. Фосфатные ДНКЖ (ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ ) на начальной стадии реакции проявляли антиоксидантные свойства, на более поздних стадиях незначительно ингибировали окисление ЛНП, что может быть обусловлено слабой стабильностью этих комплексов.



**Рисунок 1.** Влияние GS-ДНКЖ, 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. Для моделирования процессов ПОЛ в этих условиях была использована система соокисления липидов и глюкозы, в которой перекисное окисление в

липосомах из яичного фосфатидилхолина (лецитина) индуцировалось органическими свободными радикалами ( $\text{R}^\bullet$  и  $\text{ROO}^\bullet$ ), образующимися при распаде азоинициатора AIBN. Из данных, представленных на рисунке 2 (а, фиолетовая кривая), видно, что глюкоза стимулирует окисление липосом.

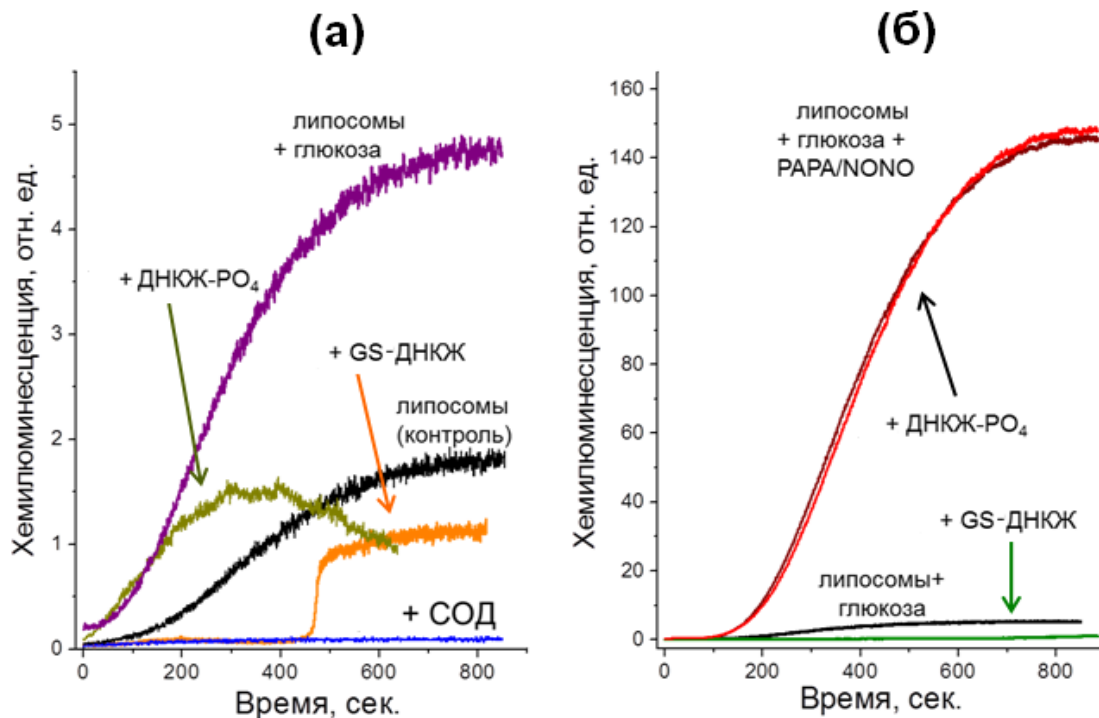
Методом люминол-зависимой хемилюминесценции было исследовано влияние GS-ДНКЖ и ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  в этой системе. В реакционной среде, содержащей липосомы и глюкозу, GS-ДНКЖ существенно увеличивали лаг-период хемилюминесценции и снижали её максимальную интенсивность (рисунок 2 а, оранжевая кривая). Эти факты свидетельствуют об эффективном ингибировании динитрозильными комплексами процесса соокисления липосом и глюкозы. ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  не влияли на лаг-период, но также уменьшали интенсивность хемилюминесценции (рисунок 2 а, зеленая кривая).

Однако, свободный NO, высвобождаемый из синтетического донора оксида азота PAPA/NONO, резко стимулировал хемилюминесценцию (рисунок 2 б, красная кривая). ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$  практически не влияли на кинетику хемилюминесценции в реакционной среде, которая содержала PAPA/NONO,



липосомы и глюкозу (рисунок 2 б, темно-красная кривая). В то же время GS-ДНКЖ ингибировали процессы свободнорадикального окисления в этой системе не менее эффективно, чем в реакционной среде, содержащей только глюкозу и липосомы (рисунок 2 б, зеленая кривая).

В модельной системе соокисления липидов и глюкозы продуцируется супероксидный радикал. На это указывает тот факт, что хемилюминесценция в этих условиях ингибируется СОД (рисунок 2 а, синяя кривая). В реакции NO с супероксидом продуцируется пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), что объясняет рост хемилюминесценции в среде, где соокисление происходит в присутствии донора оксида азота. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что глутатионовые лиганды ДНКЖ важны для нейтрализации пероксинитрита.



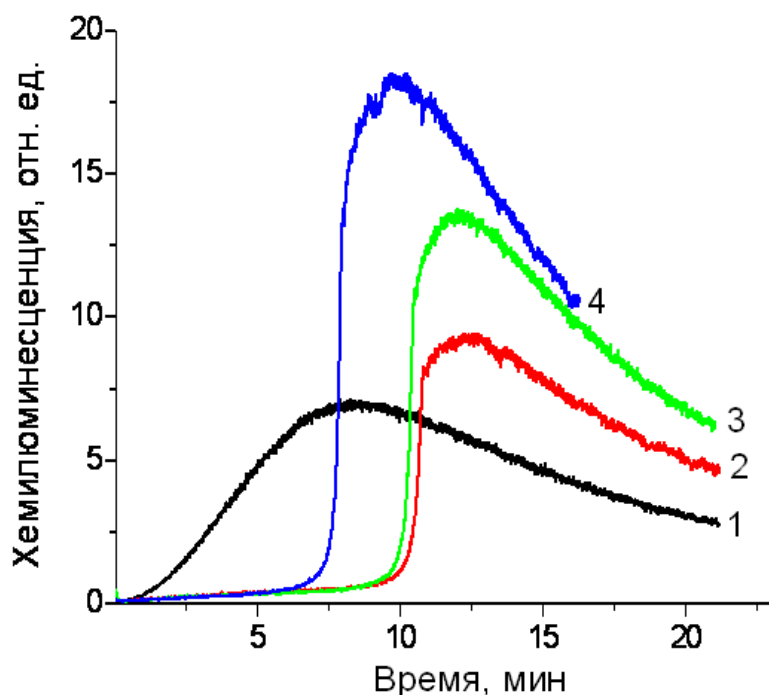
**Рисунок 2. Влияние ДНКЖ с различными лигандами (GS-ДНКЖ, ДНКЖ- $\text{PO}_4^-$ ), свободного NO на зависимую от люминола хемилюминесценцию в условиях соокисления липосом и глюкозы.** Перекисное окисление индуцировалось AIBN. Концентрация ДНКЖ составляла 70 мкМ; PAPA/NONO – 0,2 мМ, фосфатидилхолина и азоинициатора – по 1,4 мМ каждый, глюкозы – 25 мМ, СОД – 120 ед/мл. Инкубация реакционной среды происходила при постоянном перемешивании и температуре 50 °С.

Также влияние ДНКЖ на процессы ПОЛ изучалось в системе, содержащей мицеллы ПНЖК и азоинициатор AIBN (рисунок 3). Методом хемилюминесценции было показано, что количество образовавшихся липидных радикалов меняется при добавлении GS-ДНКЖ (рисунок 3). А именно, появляется значительный лаг-период хемилюминесценции, причем продолжительность его увеличивается с ростом 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 при добавлении ДНКЖ выше, чем 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.

### 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  $\text{Fe}^{2+}$ , которое катализирует реакции Фентона и Габера-Вейсса. Это затрудняет использование лекарственных форм, содержащих ДНКЖ. 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 тиоловых лигандов, входящих в состав низкомолекулярных ДНКЖ (AcCys-ДНКЖ, GS-ДНКЖ, LA-ДНКЖ).



**Рисунок 3. Влияние GS-ДНКЖ на хемиллюминесценцию в ходе перекисного окисления мицелл из линоленовой кислоты.** Перекисное окисление индуцировалось AIBN. Состав реакционной среды: 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,6), 2 мМ линоленовая кислота и 1 мМ AIBN. 1 – контроль (без добавок), 2 – 50 мкМ GS-ДНКЖ, 3 – 34 мкМ GS-ДНКЖ, 4 – 17 мкМ GS-ДНКЖ. Инкубация реакционной среды происходила при постоянном перемешивании и температуре 50 °С.

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

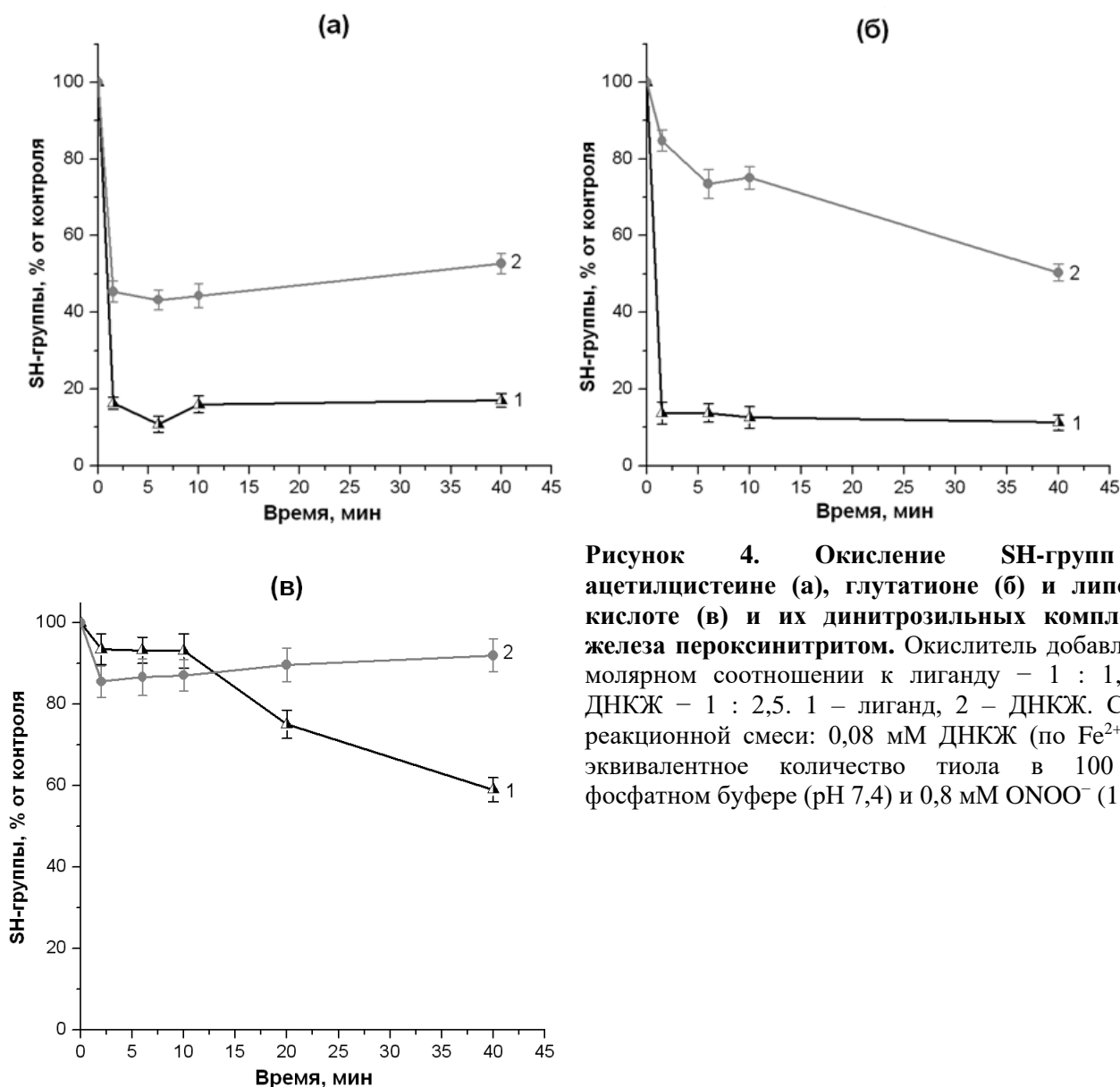
В AcCys и GSH тиоловые группы практически полностью окислялись ONOO<sup>-</sup> уже в течение первых пяти минут реакции (рисунок 4 а и б, кривые 1). В случае, когда AcCys и GSH были включены в комплексы, количество детектируемых SH-групп к концу измерения достигало примерно половины от исходного уровня (рисунок 4 а и б, кривые 2). 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 4 в).

По отношению к *t*-BOOH тиолсодержащие ДНКЖ и их лиганды оказались менее реакционноспособны. При молярном соотношении ДНКЖ : *t*-BOOH равном 1 : 25 тиоловые лиганды в AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ окислялись практически так же, как и в свободных AcCys и GSH (рисунок 5 а и б). При этом в кинетиках окисления GS-ДНКЖ и GSH значимых отличий не было (рисунок 5 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 5 г).

Добавление в реакционную смесь к GSH ионов Fe<sup>2+</sup> в концентрации, эквивалентной их содержанию в комплексах, усиливало окисление тиолов (рисунок 5 г, кривая 3). Это является еще одним доказательством того, что ионы Fe<sup>2+</sup> в комплексе с NO не проявляют выраженного прооксидантного действия. Вместе с тем, окисление тиоловых лигандов в LA-ДНКЖ не происходило, в то время как LA окислялась практически полностью (рисунок 5 в).

В реакционной среде, содержащей ионы Fe<sup>2+</sup>, органические гидропероксиды и тиолы, протекают следующие реакции [Tien et al., 1982; Yones, Strubelt, 1990; Olson et al., 2018]:



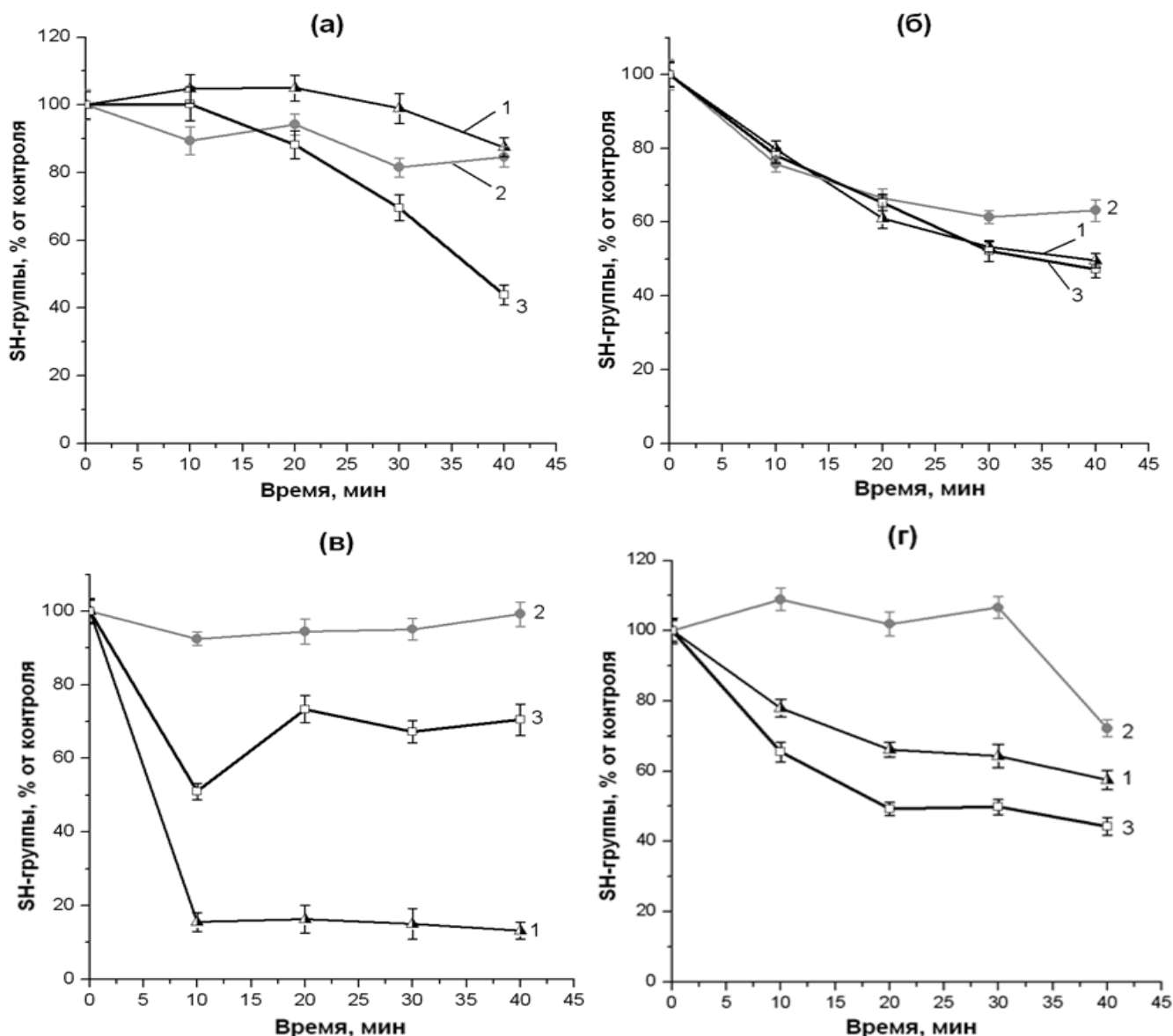


**Рисунок 4. Окисление SH-групп в ацетилцистеине (а), глутатионе (б) и липоевой кислоте (в) и их динитрозильных комплексах железа пероксинитритом.** Окислитель добавляли в молярном соотношении к лиганду – 1 : 1,25, к ДНКЖ – 1 : 2,5. 1 – лиганд, 2 – ДНКЖ. Состав реакционной смеси: 0,08 мМ ДНКЖ (по  $Fe^{2+}$ ) или эквивалентное количество тиола в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и 0,8 мМ  $ONOO^-$  (1 : 10)

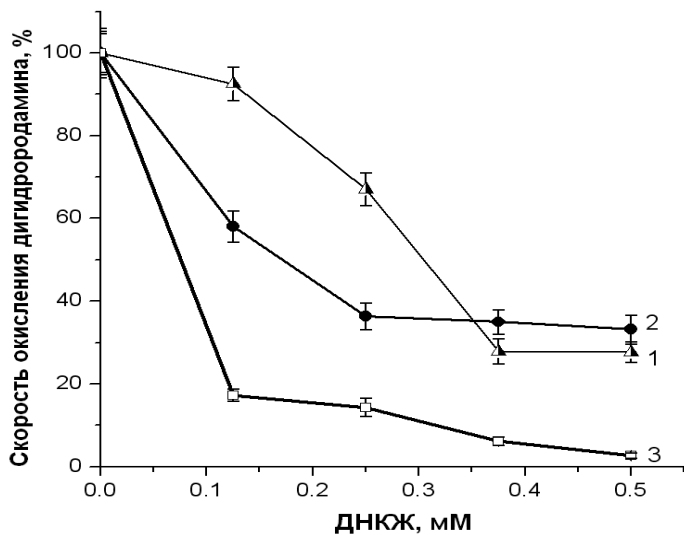
Основную роль в процессах перекисного окисления липидов и других биомолекул играют реакции (1) и (2), в которых образуются алкоксильные ( $RO^*$ ) и алкилперекисные радикалы ( $ROO^*$ ). Следует отметить, что эти реакции будут происходить и в присутствии примесных ионов железа, т.е. без дополнительного введения последних в среду. В реакции (4) тиолы выступают в качестве антиоксидантов, восстанавливая эти радикалы.

#### **Влияние ДНКЖ на окисление дигидрородамина пероксинитритом**

Способность ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления дигидрородамина (DHR123) пероксинитритом, образующимся при распаде 3-морфолино сиднонимина (SIN-1) [Singh et al., 1999]. На рисунке 6 представлены кинетики окисления пероксинитритом дигидрородамина до родамина. ДНКЖ дозозависимо снижали скорость окисления дигидрородамина, причем LA-ДНКЖ оказались более эффективными перехватчиками  $ONOO^-$ . При концентрации ДНКЖ 0,125 мМ AcCys-ДНКЖ снижали скорость окисления DHR123 на 7%, GS-ДНКЖ – на 42% и LA-ДНКЖ – на 83%. Этот результат можно объяснить реакцией между  $ONOO^-$  и тиоловыми лигандами. Образующийся в этой реакции тиильный радикал может быстро реагировать с NO-лигандом ДНКЖ, в результате чего возможно образование S-нитрозотиола.



**Рисунок 5.** 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 случаях (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*-VOOH – 2 мМ/0,2 мМ.



**Рисунок 6.** 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 20 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4). ДНКЖ вносили в реакцию через 5 минут после начала реакции.

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 [Лобышева и др., 1999; Shumaev et al., 2008; Tran et al., 2011], а также с их переходом в более стабильную биядерную форму [Vanin et al., 2011, Vanin 2016]. При действии на комплексы гидропероксида *трет*-бутила защитное действие наблюдалось только в случае LA-ДНКЖ, что может быть связано с большей стабильностью и липофильностью этих комплексов.

Полученные результаты подтверждают, что координация железом тиоловых лигандов и NO, с одной стороны, защищает тиолы от окисления, и, с другой стороны, снижает прооксидантное действие Fe<sup>2+</sup>. Таким образом, можно заключить, что наличие связанного железа в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, не является препятствием для использования этих комплексов в медицинской практике.

## 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. Известно, что NO и такие его эндогенные метаболиты как HNO и ONOO<sup>-</sup> влияют на активность дыхательной цепи и продукцию активных форм кислорода [Iglesias et al., 2015]. Вместе с тем, формирование и возможные функции ДНКЖ в митохондриях изучены недостаточно. В частности, неясно, может ли участвовать в образовании этих комплексов нитроксила (NO<sup>-</sup>/HNO).

В работе изучали синтез ДНКЖ в изолированных митохондриях с использованием S-нитрозосцистеина (Cys-NO) в качестве донора NO. 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, Cys-NO железо и избыток цистеина, наблюдалось образование ДНКЖ с цистеиновыми лигандами (Cys-ДНКЖ) (рисунок 7 а). О присутствии в среде именно этих комплексов, судили по характерному спектру ЭПР, который аналогичен спектру ДНКЖ, зарегистрированному ранее в модельной системе без митохондрий.

При смене газовой среды, которой продували образец, на кислород амплитуда сигнала ЭПР уменьшается, что свидетельствует о снижении концентрации ДНКЖ в образце. Уже после 8-минутного воздействия кислорода на образец концентрация ДНКЖ снизилась до ~18% от исходного уровня. Тем не менее, скорость разрушения ДНКЖ не изменилась в случае стимулированной антимицином А (блокатор комплекса III – комплекс цитохромов bc<sub>1</sub> электрон-транспортной цепи) генерации O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (рисунок 7 б, кривая 2). Максимальная концентрация ДНКЖ, напротив, увеличилась. Парадоксальный результат этого исследования – значительно более быстрое снижение концентрации ДНКЖ в аэробных условиях после добавления СОД и каталазы (рисунок 7 б, кривая 3). Способность этих антиоксидантных ферментов защищать ДНКЖ от O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-индуцированной деградации была ранее продемонстрирована в работе [Shumaev et al., 2008].

Принимая во внимание способность комплекса III высвобождать O<sub>2</sub><sup>•-</sup> в матрикс и межмембранное пространство [Muller, 2004; Bleier, Droese, 2013], было сделано предположение, что этот эффект может быть связан с взаимодействием Cys-NO с O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Реакция O<sub>2</sub><sup>•-</sup> с RSNO, как правило, приводит к образованию NO, тиола и молекулярного кислорода [Trujillo, 1998]:



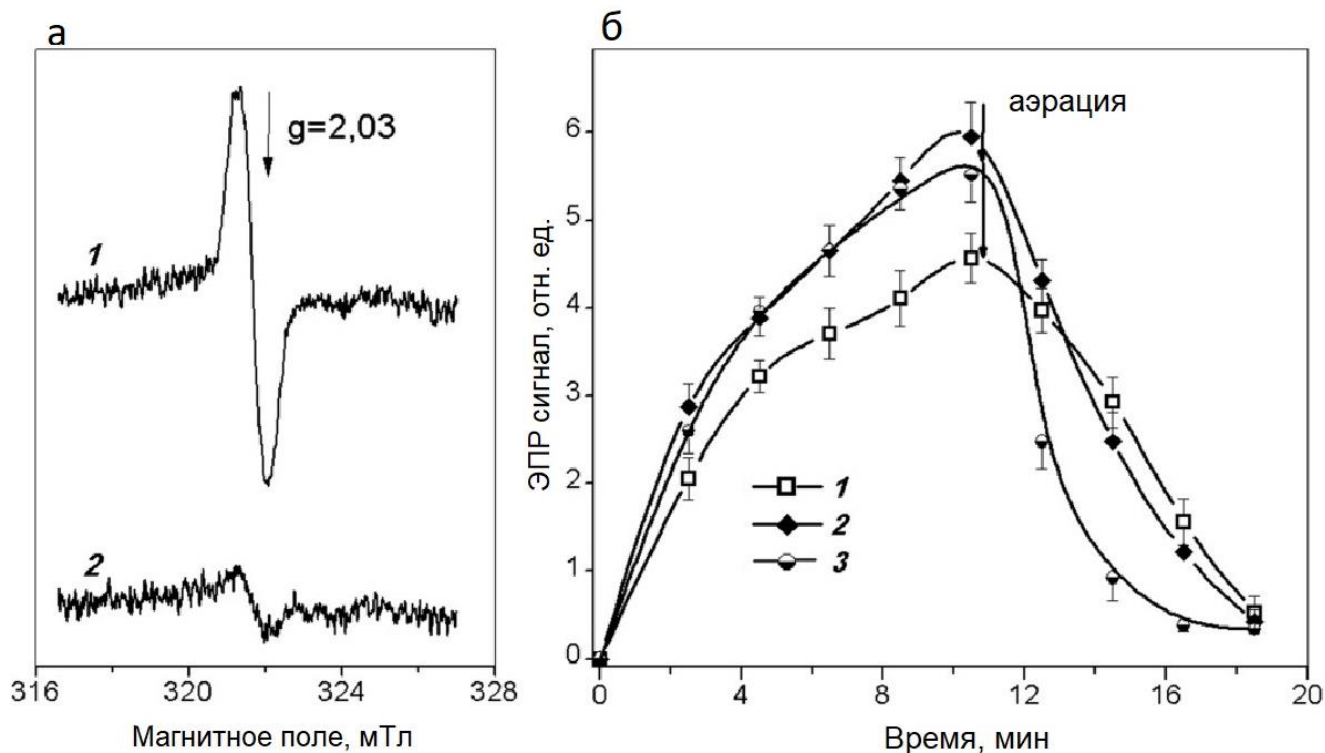
Другими возможными продуктами взаимодействия RSNO с O<sub>2</sub><sup>•-</sup> являются NO<sup>-</sup> и OONO<sup>-</sup>:



Тиольные радикалы RS<sup>•</sup> и RSOO<sup>•</sup> также способны инициировать разложение RSNO до NO [Karoui, 1996]:



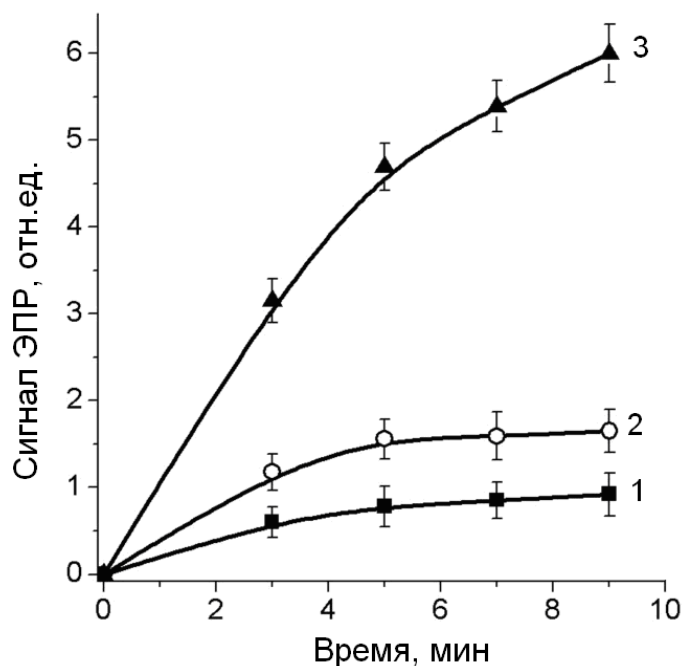
Вклад нитроксильного аниона в синтез ДНКЖ также нельзя исключить. Депротонированная форма нитроксила (нитроксильный анион,  $\text{NO}^-$ ) может быть донором NO в организме и соответственно включаться в состав нитрозильных комплексов железа.



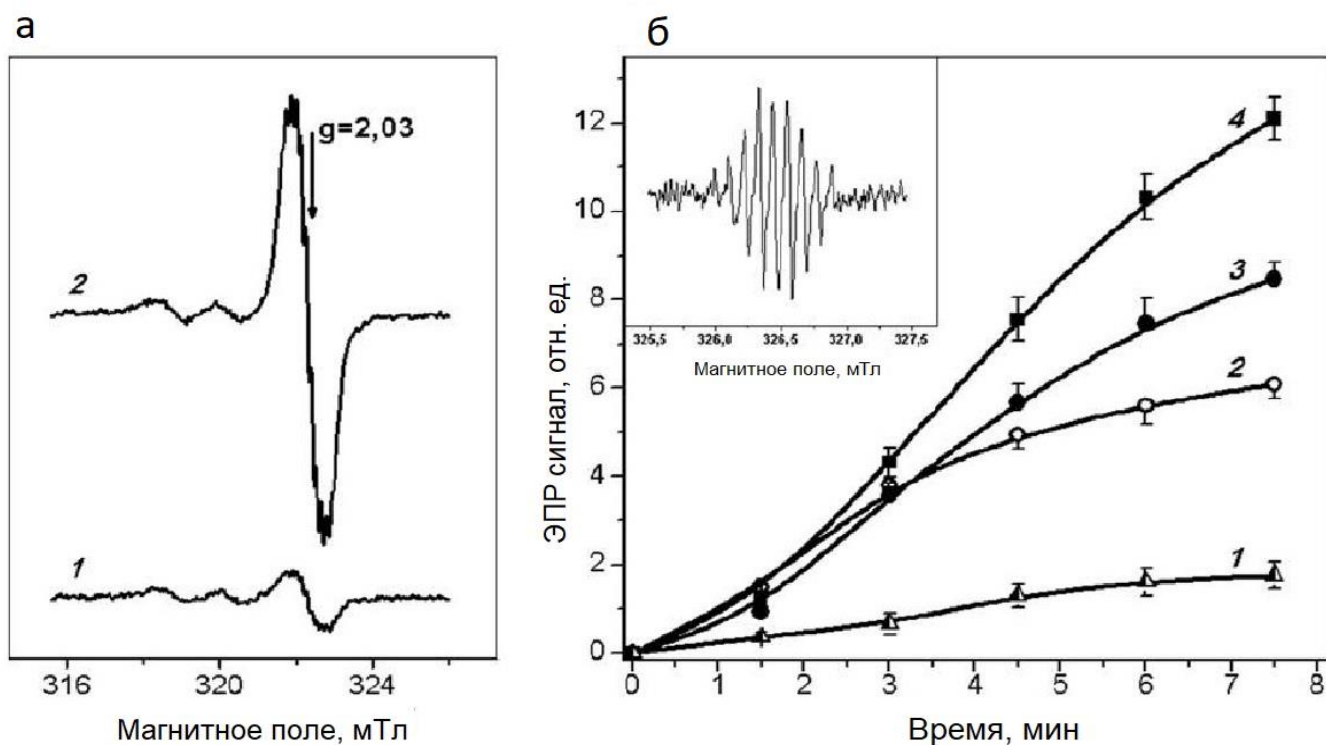
**Рисунок 7. Образование ДНКЖ в суспензиях изолированных митохондрий сердца крысы.** (а) Спектры ЭПР ДНКЖ с тиоловыми лигандами, зарегистрированные после 10 минут инкубации в анаэробных условиях (1) и через 8 минут после перехода в аэробные условия (2). (б) Кинетика образования ДНКЖ в инкубационной среде, 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.

Характерной особенностью  $\text{O}_2^{\bullet-}$  является его способность выделять железо из аконитазы и ферритина [Viemond, 1988; Va'squez-Vivar, 2002]. Митохондриальные изоформы этих белков являются источниками двухвалентного железа, необходимого для синтеза ДНКЖ. В проведенных исследованиях ферритин и GSNO, добавленные в реакционную среду, запускали синтез ДНКЖ; сигнал ЭПР возрастал за счет  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , генерируемого митохондриями (рисунок 8). Возможно, что супероксид способствует синтезу ДНКЖ, увеличивая концентрацию NO в среде и высвобождая железо из белков переносчиков.

В экспериментах, моделирующих гипоксию, исследовали образование Cys-ДНКЖ. Инкубационная среда содержала соль Ангели в качестве донора  $\text{NO}^-$  ( $\text{HNO}$ ), ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и цистеин. Добавление водорастворимого убихинона (коэнзима  $\text{Q}_1$ ) в реакционную среду значительно увеличивало выход ДНКЖ с тиоловыми лигандами, причем эффект  $\text{CoQ}_1$  был количественным (рисунок 9). Кроме того с помощью спектроскопии ЭПР зарегистрировано появление семихинона  $\text{CoQ}_1$  (рисунок 9 б, вставка).



**Рисунок 8. Кинетика образования GS-ДНКЖ.** Реакционная среда содержала: (1) 100 мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 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.



**Рисунок 9. Формирование Cys-ДНКЖ с участием нитроксила.** Реакционная среда содержала 100 мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,4), 1 мМ FeSO<sub>4</sub>, 20 мМ цистеина, 5 мМ соли Ангели (донор NO<sup>-</sup>/HNO). **(а)** Спектры ЭПР Cys-ДНКЖ, зарегистрированные в реакционной среде в отсутствии (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) коэнзима Q<sub>1</sub>. Среда инкубировалась при продувке азотом 7,5 минут, концентрация коэнзима Q<sub>1</sub> составляла 3,8 мМ. **(б)** Кинетика формирования ДНКЖ в реакционной среде без добавок (кривая 1), а также после добавления в неё коэнзима Q<sub>1</sub> 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 Q<sub>1</sub>, который был зарегистрирован в условиях, моделирующих гипоксию.



Можно предположить, что при взаимодействии коэнзима  $Q_1$  с  $NO^-(HNO)$  происходит одноэлектронное окисление последнего в соответствии с реакцией:



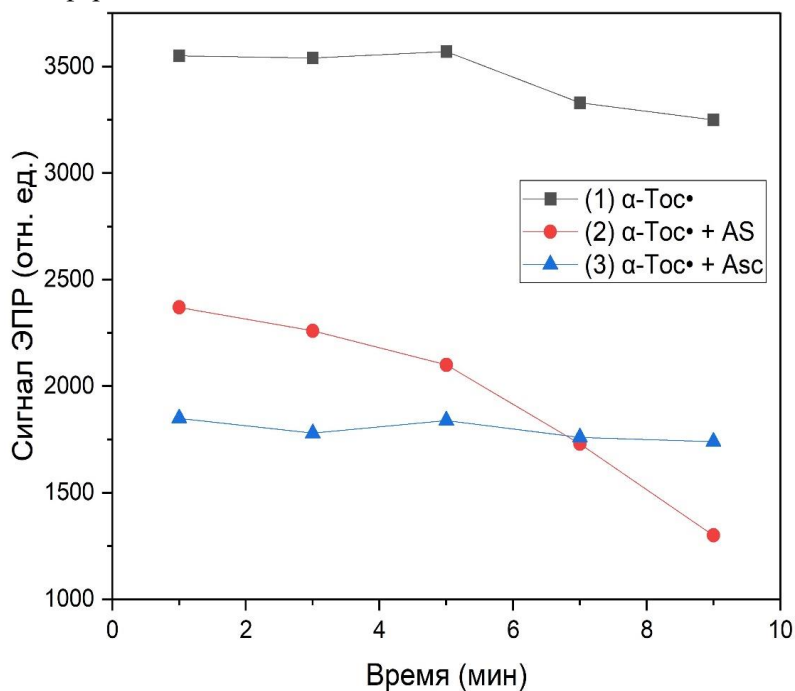
Генерируемый в этой реакции свободный NO может включиться в состав ДНКЖ. Наблюдаемое уменьшение скорости формирования ДНКЖ при азрации (рисунок 9 б, кривая 2) можно объяснить образованием  $ONOO^-$  при взаимодействии  $NO^-$  с  $O_2$ .

Таким образом, было показано, что ДНКЖ действительно образуются 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.

### 3.2.2. Взаимодействие нитроксила с токоферолом

В организме убихинон, взаимодействуя с нитроксилом, превращается в убисемихинон и далее участвует в переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий. Интересно, что в живых системах восстановленная форма убихинона, убихинол, является антиоксидантом, восстанавливающим радикальную форму другого антиоксиданта –  $\alpha$ -токоферола. Регенерация ключевого гидрофобного антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола является важнейшим механизмом, ингибирующим свободнорадикальное окисление липидов [Бурлакова с соавт., 1998; González-Pérez 2008]. В 2007 году Лопезом [López et al, 2007] была высказана гипотеза о том, что поскольку нитроксил  $NO^-(HNO)$  имеет величину редокс потенциала равную – 0,8 В, он должен быть хорошим восстановителем для токоферола или убихинона.

Так как токофероксильный радикал является резонансно-стабилизированным, его концентрация остается постоянной в течение десятков минут, что делает удобным изучение этого радикала методом ЭПР. Из представленных на рисунке 10 данных видно, что добавление нитроксила приводит к заметному уменьшению величины сигнала токофероксильного радикала. Также значительно увеличивается скорость падения сигнала токофероксильного радикала, причем значительное изменение его концентрации происходит в течение первых минут. Суммарный эффект от добавления нитроксила и аскорбиновой кислоты превосходит эффект нитроксила в отдельности. Аскорбиновая кислота была использована как стандартный гидрофильный антиоксидант, эффективно восстанавливающий радикал токоферола в живых системах.



**Рисунок 10.** Сигнал токофероксильного радикала и его изменение при добавлении нитроксила или аскорбата. Состав реакционной смеси: (1) 70 мМ  $\alpha$ -Тос; (2) – (1) + соль Ангели; (3) – (1) + аскорбиновая кислота. В качестве реакционной среды использовали смесь изопропанола (75%) и Na,K-фосфатного буфера (25%). Конечная концентрация буфера 25 мМ (pH 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 E с

нитроксилом вероятно происходит в соответствии со следующей реакцией:





Таким образом, в проведенных экспериментах было впервые показано, что нитроксил на самом деле 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 реагирует с радикальными формами таких антиоксидантов как CoQ и  $\alpha$ -токоферол.

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

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

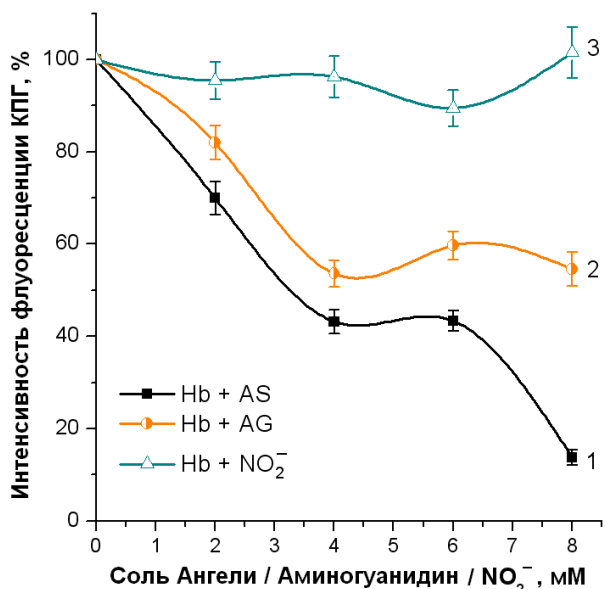
Окислительный стресс тесно связан с карбонильным [Baynes, 1991; Yim et al., 1995; Kosmachevskaya et al., 2014; Nakamura, Kawaharada, 2021; Shumaev et al., 2009, 2023]. При взаимодействии аминокислот с метилглиоксалем (MG) образуются свободнорадикальные интермедиаты: катион радикал основания Шиффа и анион радикал MG (семидион) [Kosmachevskaya et al., 2014; Shumaev et al., 2023]. При наличии кислорода в среде анион радикал MG может восстанавливать кислород до супероксид-аниона.

В настоящее время ведется поиск новых препаратов, которые могли бы ингибировать реакции неферментативного гликирования. Идеальный ингибитор одновременно является «ловушкой» активных карбонильных соединений, антиоксидантом и хелатором редокс-активных ионов металлов (меди и железа), которые катализируют образование конечных продуктов гликирования (КПГ) [Song et al., 2021]. Доноры нитроксила (соль Ангели, кислота Пилоти и др.) обладают совокупностью свойств, позволяющих рассматривать их в качестве потенциальных антигликирующих препаратов. Поэтому была поставлена задача изучить влияние  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  на модификацию гемоглобина в реакциях окисления и гликирования.

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

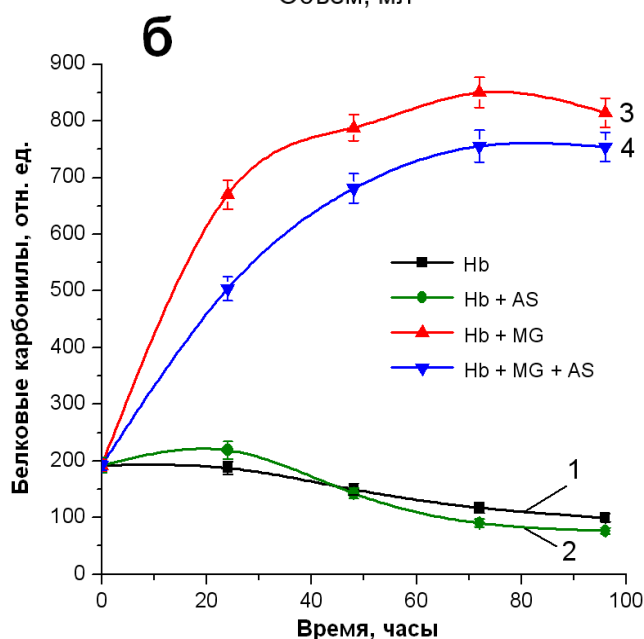
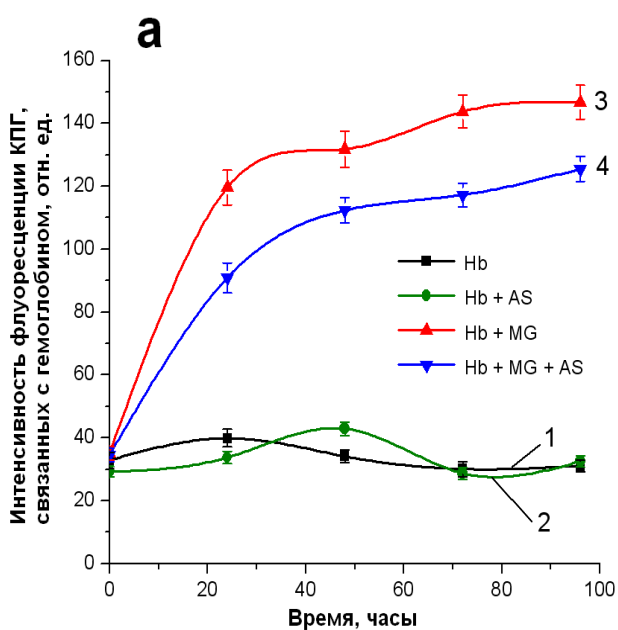
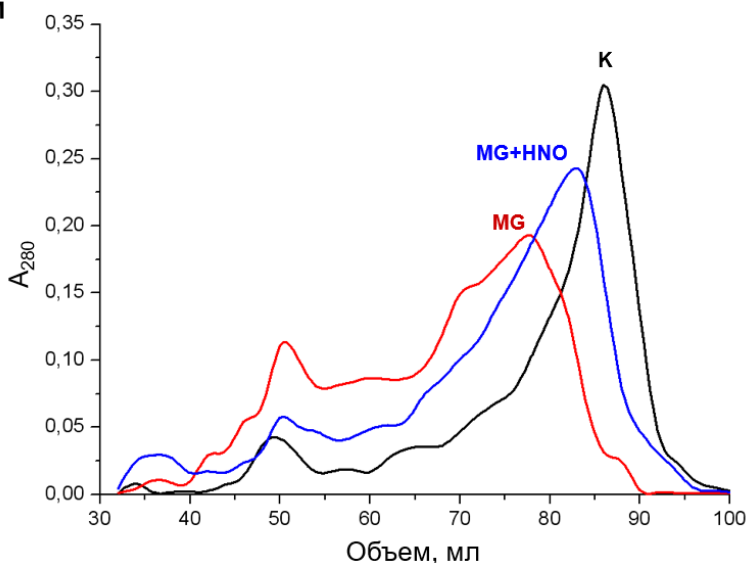
Донор нитроксила (соль Ангели) и аминоксидин дозозависимо ингибировали образование флуоресцирующих КПГ (рисунок 11, кривые 1 и 3). Причем ингибирующее действие соли Ангели было более выражено, чем аминоксидина. Аминоксидин выступал в качестве стандартного антигликирующего соединения (положительный контроль) [Thornalley et al., 2000; Song et al., 2021]. Поскольку известно, что при разложении соли Ангели образуется один моль  $\text{HNO}$  и один моль  $\text{NO}_2^-$ , было исследовано действие тех же концентраций  $\text{NO}_2^-$  на образование КПГ (рисунок 11, кривая 2). Ионы нитрита не оказывали влияния на процесс гликирования гемоглобина метилглиоксалем, что свидетельствует о том, что наблюдаемый антигликирующий эффект соли Ангели обусловлен действием  $\text{HNO}$ . Можно предположить, что антигликирующее действие нитроксила обусловлено его антиоксидантными свойствами.

Поскольку в ходе реакций неферментативного гликирования образуются КПГ, формирующие межбелковые сшивки, было исследовано влияние донора нитроксила на образование поперечно-сшитых форм Hb с помощью гель-проникающей хроматографии. Профиль элюции интактного Hb имел два выраженных пика при 50 мл и 82 мл (рисунок 12, черная кривая), которые соответствуют димерной и мономерной формам Hb. Причем пик 50 мл представлял собой незначительную фракцию. Инкубация Hb с MG приводила к уменьшению фракции мономера и увеличению фракций, локализованных между первым и вторым пиками (рисунок 12, красная кривая). Также модификация MG приводила к формированию крупных белковых агрегатов, которые не проникали в колонку, оседая в поверхностном слое носителя. Нитроксил оказывал защитное действие на гемоглобин (рисунок 12, синяя кривая). При этом он снижал не только количество молекул Hb, содержащих КПГ, но и количество сшитых высокомолекулярных молекул белка.



**Рисунок 11. Образование флуоресцирующих конечных продуктов гликирования в реакции гемоглобина с метилглиоксалем.** Влияние различных концентраций (1) – соли Ангели (AS), (2) – амингуанидина (AG), (3) – ионов нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Данные представлены в % от уровня КПП, образованных в контрольном образце. Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,4), 54 мМ MG. Смесь инкубировали в течение 24 часов при 37 °С.

**Рисунок 12. Профиль элюции гемоглобина на колонке Toyopearl HW-55F.** Контрольный вариант (без добавок) – черная кривая, в присутствии метилглиоксаля – красная кривая, в присутствии метилглиоксаля и соли Ангели – синяя кривая. metHb инкубировали с 13,5 мМ MG или MG и 8 мМ солью Ангели в течение 24 часов.

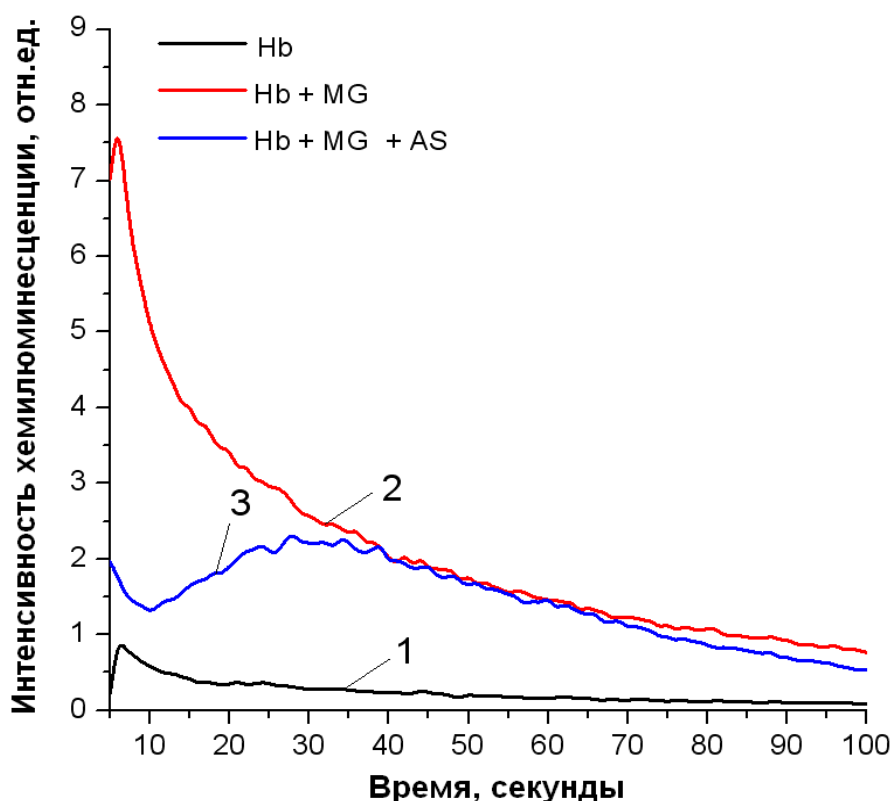


**Рисунок 13. Влияние нитроксида на образование флуоресцирующих КПП (а) и карбонильных групп (б) в реакции гемоглобина с метилглиоксалем.** Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,4), 54 мМ MG, 3,2 мМ соли Ангели (AS).

На следующем этапе было изучено действие соли Ангели на модификацию Hb метилглиоксалем во времени. Добавка соли Ангели к реакционной среде снижала уровень флуоресцирующих КПП и белковых карбониллов приблизительно на 30% через 24 часа (рисунок 13 а и 13 б, синяя и красная кривые), причем ингибирующий эффект сохранялся в течение всего времени инкубации (96 часов).

#### **Влияние нитроксила на образование свободно-радикальных продуктов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем**

С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции оценивали уровень свободнорадикальных интермедиатов, образуемых в реакционной системе, содержащей Hb, который в течение 24 часов инкубировали с MG (13,5 мМ), а также с MG (13,5 мМ) и солью Ангели (8 мМ). Хемилюминесценцию в реакционной смеси индуцировали добавлением люминола. На рисунке 14 представлены кривые, зарегистрированные непосредственно после внесения люминола. Несмотря на то, что удалось зарегистрировать нисходящую часть кривых хемилюминесценции, видно, что донор нитроксила существенно снижает количество свободно-радикальных продуктов реакции.



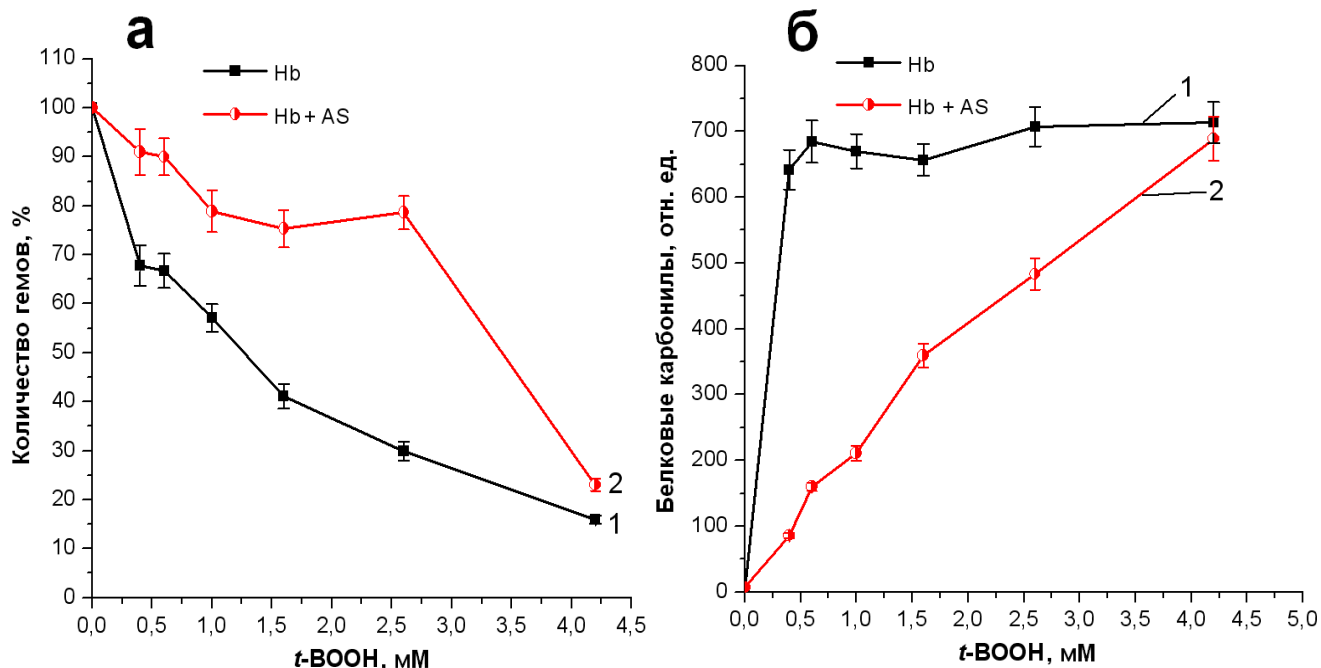
**Рисунок 14. Влияние соли Ангели на образование свободнорадикальных продуктов в реакции гемоглобина с метилглиоксалем.**

Контрольный вариант (без добавок) – черная кривая (1), в присутствии метилглиоксала – красная кривая (2), в присутствии 13,5 мМ метилглиоксала и 8 мМ соли Ангели – синяя кривая (3). Перед измерением добавляли люминол до конечной концентрации 2 мМ.

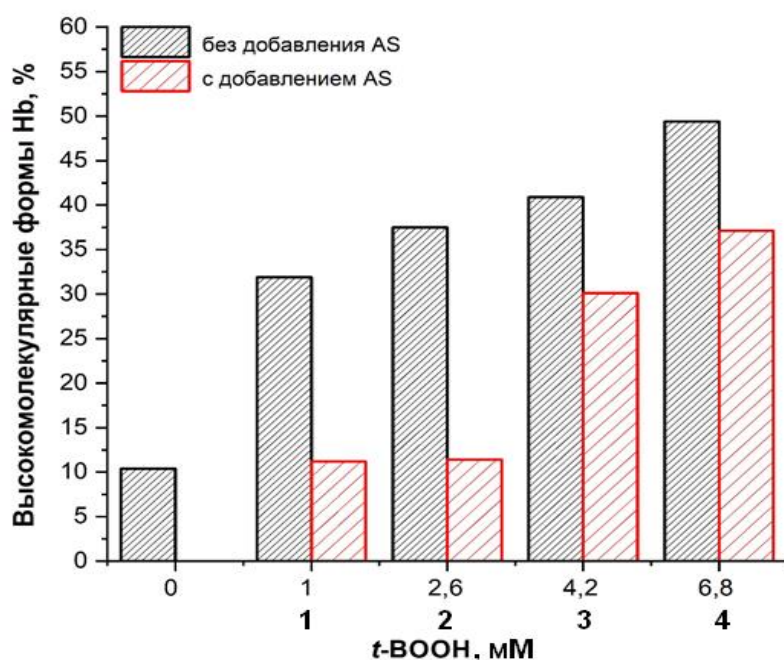
#### **Влияние нитроксила на окислительную модификацию гемоглобина в реакции с *t*-BOOH**

Поскольку известно, что гликирование Hb метилглиоксалем приводит к деградации гемовой группы за счет образования активных форм кислорода [Nagababu et al., 2004; Goodarzi et al., 2014], было решено исследовать влияние соли Ангели на окислительную модификацию Hb в реакции с *t*-BOOH.

Под действием различных концентраций *t*-BOOH происходило разрушение гемовой группы Hb (рисунок 15 а, черная кривая). Добавление в реакционную смесь соли Ангели оказывало значительный защитный эффект на гем (рисунок 15 а, красная кривая). Кроме этого, в данной экспериментальной системе донор нитроксила препятствовал образованию новых карбонильных групп белка (рисунок 15 б, красная кривая), возникающих вследствие окислительного повреждения аминокислотных остатков Hb. Особенно выражен защитный эффект донора нитроксила при низких концентрациях *t*-BOOH. Это также подтверждают данные SDS-электрофореза в 12% ПААГ (рисунок 16).



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

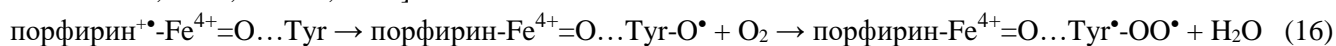


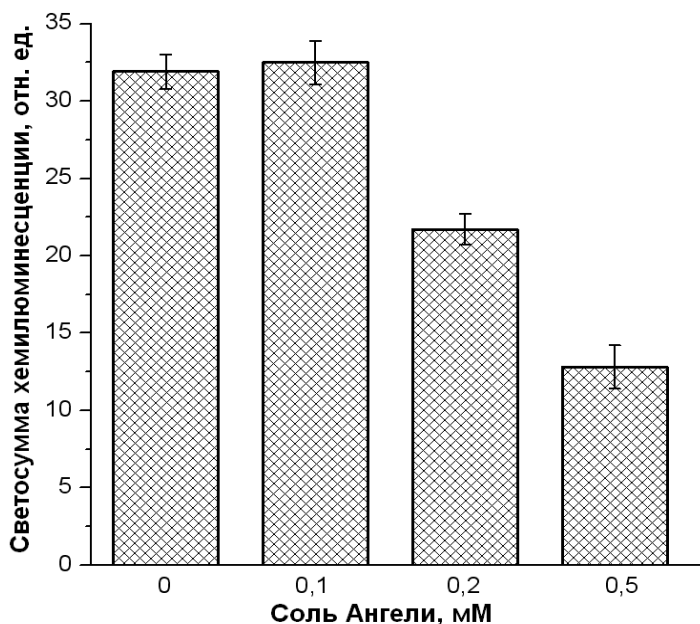
**Рисунок 16.** Влияние соли Ангели на образование высокомолекулярных форм metHb под действием гидропероксида *трет*-бутила. За 100 % принято содержание Hb в контрольном варианте. Состав реакционной смеси как в подписи к рисунку 15. Данные, представленные на диаграмме, получены при обработке электрофоретического изображения с использованием программы Image Lab Software – Bio-Rad. Электрофорез в 12% SDS/ПААГ.

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

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции Hb с гидропероксидом *трет*-бутила регистрировали с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. Соль Ангели дозозависимо снижала образование свободных радикалов (рисунок 17).

Взаимодействие Hb с гидропероксидами приводит к двухэлектронному окислению белка с образованием оксоферрильного интермедиата с катион-радикалом на порфириновом кольце (порфирин<sup>+</sup>-Fe<sup>4+</sup>=O), который мигрирует на аминокислоту, чаще всего тирозин [Svistunenکو et al., 2002; Svistunenکو, 2005; Reeder, 2017]:





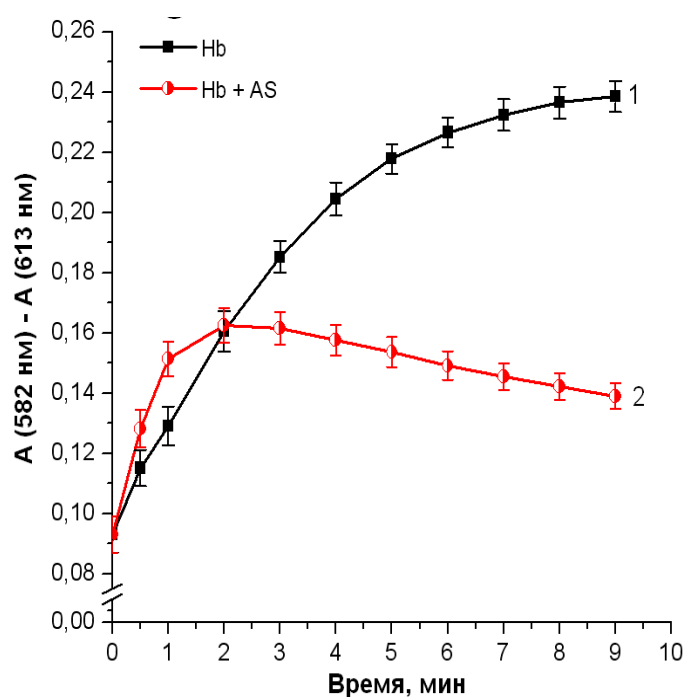
**Рисунок 17.** Влияние соли Ангели на образование свободно-радикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила, измеренных с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. Состав реакционной смеси: 0,15 мМ metHb, 2 мМ люминола, 0,6 мМ *t*-BOOH в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4). Данные представлены как светосумма хемилюминесценции за 300 секунд.

В наших экспериментах показано, что нитроксил восстанавливает оксоферрильный интермедиат, согласно реакции:

$$\text{порфирин-Fe}^{4+}=\text{O} + \text{HNO} \rightarrow \text{порфирин-Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \text{NO} \quad (17)$$

Добавление соли Ангели в эквимольном количестве к раствору гемоглобина приводило к практически полному восстановлению  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$  до metHb, а также замедляла образование  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$  в системе окисления Hb гидропероксидом *трет*-бутила (рисунок 18).

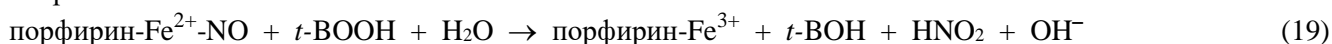
**Рисунок 18.** Влияние соли Ангели на образование оксоферрилHb в реакции metHb с гидропероксидом *трет*-бутила. Состав реакционной смеси: 0,03 мМ Hb в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4), 0,71 мМ *t*-BOOH. Соль Ангели вносили одновременно с *t*-BOOH в концентрации 0,4 мМ. За накоплением  $\text{Hb-Fe}^{4+}=\text{O}$  следили по разности поглощения при 582 нм и 613 нм (ближайшая изобестическая точка).



Нитроксил с окисленным железом гема вступает в реакцию восстановительного нитрозилирования (для 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 нитрозилHb было зарегистрировано в экспериментальной системе при добавлении соли Ангели к metHb. Вместе с тем, нитрозилирование гемоглобина под действием HNO практически полностью ингибировало образование свободных радикалов за счет восстановления *t*-BOOH нитрозилHb:



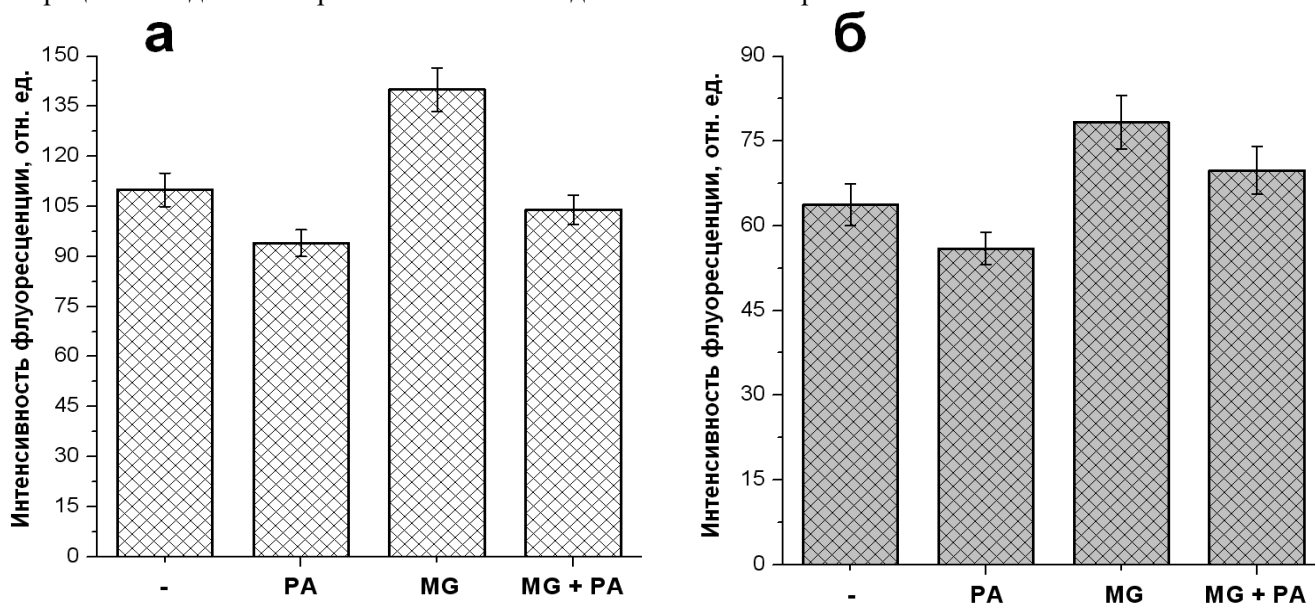
Таким образом, антиоксидантное действие нитроксильного аниона в исследуемой реакционной системе также может быть обусловлено реакциями (18) и (19). Полученные результаты показали, что нитроксил может снизить уровень окислительного стресса и повреждение биомолекул, вызванных неферментативным гликированием.

### 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 (п. 3.3.1.), была поставлена задача исследовать его влияние на клетки *Escherichia coli*, выращенные в присутствии метилглиоксаля (активного карбонильного соединения). В качестве донора  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  использовали кислоту Пилоти, которая медленно ( $k_{\text{max}} \sim 10^{-3} \div 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  при  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) выделяет  $\text{HNO}$  [DuMond, King, 2011]. 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).

Добавление MG к бактериальной культуре приводило к полному подавлению роста низкоаэрируемых бактерий в период с 2 до 10 часов, в то время как в нормально аэрируемых культурах происходило замедление роста. Также различалось и влияние донора нитроксила на эти культуры. В первом случае  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  оказывал цитопротекторное действие, во втором случае эффект был незначительным. Также было исследовано влияние нитроксила на накопление связанных с белками КПП через 24 часа культивирования (в стационарной фазе) (рисунок 19). В слабоаэрируемых культурах уровень КПП практически в два раза превышал их уровень в нормально аэрируемых культурах. Этот эффект объясняется активацией гликолиза и связанной с этим повышенной продукцией MG. Добавление MG к обоим типам культур усиливало образование КПП примерно на 25%, в то время как добавление нитроксила – снижало. Антигликирующее действие нитроксила на клетки *E. coli* было более выражено в присутствии MG. В слабоаэрируемых культурах нитроксил снижал содержание КПП до уровня контрольного варианта.

Цитотоксическое и цитопротекторное действие MG и  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  на бактерии оценивали по восстановлению МТТ цитоплазматическими дегидрогеназами до нерастворимого формазана. Показатели МТТ-теста у слабоаэрируемых культур были на 20% ниже, чем у нормально аэрируемых. 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. Эти данные хорошо соотносятся с данными по гликированию клеточных белков.



**Рисунок 19.** Флуоресценция (отн. ед.) растворимой фракции белков клеточного экстракта *E. coli*, Бактерии выращивали в условиях пониженной аэрации – (а) и нормальной аэрации – (б).  $\lambda_{\text{возб}} = 325 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 492 \text{ нм}$ .



Таким образом, нитроксил защищал 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.

### 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 ( $\text{HNO}$ ). 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 20).

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.

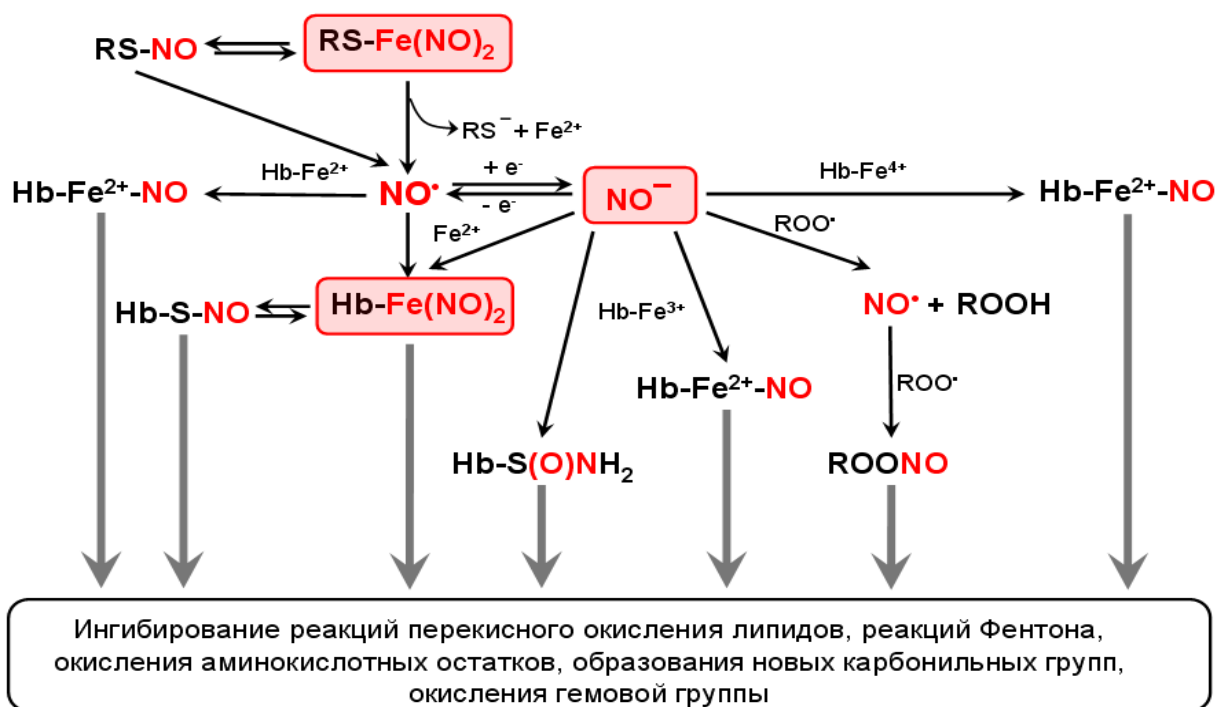


Рисунок 20. Процессы, обеспечивающие антиоксидантное действие ДНКЖ и  $\text{HNO}(\text{NO}^-)$  в системах, содержащих липиды и гемоглобин.

## 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.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1) Shumaev K.B., Dudylyna 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. N 3. P. 237-244. DOI: 10.1002/biof.1418

2) Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Влияние нитроксила на клетки *Escherichia coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. № 5. С. 1-8. DOI: 10.31857/S0555109922050117

3) Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., **Pugachenko I.S.**, Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and antioxidant effect of nitroxyl towards hemoglobin. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. N 10. e2007. DOI: 10.3390/antiox11102007

4) **Пугаченко И.С.**, Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Действие пероксинитрита и гидропероксида *трет*-бутила на тиоловые лиганды динитрозильных комплексов железа. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 5. С. 440-449. DOI: 10.31857/S0555109923050148

### Статьи в других рецензируемых научных изданиях:

1) **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К., Шумаев К.Б. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа с различными лигандами. // *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2018. Т. 5. № 3. С. 62-65.

2) Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Новикова Н.Н., Топунов А.Ф. Антиоксидантное и антигликирующее действие доноров нитроксила в экспериментальных системах с метилглиоксалем. // *Актуальная биотехнология*. 2022. № 1. С. 219-222.

3) Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Динитрозильные комплексы железа защищают гемоглобин и эритроциты от действия окислителей. // *Актуальная биотехнология*. 2022. № 1. С. 215-218.



4) Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Грачев Д.И., Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Рууге Э.К. Новые варианты динитрозильных комплексов железа. Антиоксидантное и антирадикальное действие. // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2022. Т. 7. № 4. С. 624-627. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0572

#### **Основные публикации в материалах научных конференций:**

1) **Пугаченко И.С.**, Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Влияние нитроксила на модификацию гемоглобина окислением и гликированием. // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22 (Гурзуф, с 29 мая по 8 июня 2022 г.). 2022. Весенняя сессия. С. 215-219. ISBN 978-5-6044060-2-1. DOI:10.47501/978-5-6044060-2-1.215-219

2) Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Нитроксил защищает гемоглобин от окисления и гликирования. // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины. / Материалы Юбилейной научно-практической конференции: «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра», 2022 г., Сухум, Абхазия. Сухум: ГНУ ИЭПиТ АНА, 2022. С. 218-222.

3) **Пугаченко И.С.**, Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К., Мартусевич А.К. Нитролипиды: образование и биологическая активность. // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Eс`2019. Весенняя сессия. Москва, Россия, 2019. М.: Институт новых информационных технологий, 2019. С. 254-257. <https://elibrary.ru/item.asp?id=38571196>

4) Космачевская О.В., Шумаев К.Б., **Пугаченко И.С.**, Рууге Э.К., Топунов А.Ф. Дипептид карнозин как лиганд комплексов железа с оксидом азота. // II Объединенный научный форум: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. Под ред. Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова, А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского. Сочи – Дагомыс, Россия. 1–6 октября 2019. М.: «Перо», 2019. Т.2. ISBN 978-5-00150-519-8 (Общ.), ISBN 978-5-00150-521-1 (Т.2.) Acta Naturae. Спецвыпуск, Том 1. 2019. С. 48.

5) **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Шумаев К.Б. Активные формы азота и карбонильные соединения как факторы экологического риска и их детоксикация в биологических системах. // Научная неделя молодых ученых и специалистов в области биологических наук-2017. Материалы Международной конференции. 20–25 ноября 2017 года (Петрозаводск, Карелия, Россия). Петрозаводск, 2017. С. 437-445. ISBN 978-5-9274-0800-9.

6) Шумаев К.Б., Тимошин А.А., Дудылина А.Л., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Использование спектроскопии электронного парамагнитного резонанса для изучения антиоксидантных свойств метаболитов оксида азота. // XXV Съезд по спектроскопии, Троицк, Москва, Россия, 3-7 октября 2016. Сборник тезисов, С. 411-412.

7) Shumaev K.B., Ruuge E.K., Dudylyna A.L., **Pugachenko I.S.**, Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Nitroxyl anion as a trigger of antioxidant and prooxidant processes. // Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine (Krakow, October 2-6, 2016). Сборник статей, С. 124.

8) Шумаев К.Б., Дудылина А.Л., **Пугаченко И.С.**, Гречникова М.А., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа. // Международная научная конференция двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 28-30 июня 2016 г. Сборник статей. Часть 1, С. 403-406.