

УДК 577.121:577.112.3

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И КАРНОЗИНОВЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БИОМОЛЕКУЛ

© 2024 г. Э. И. Насыбуллина¹, О. В. Космачевская¹, К. Б. Шумаев¹,
А. Ф. Топунов^{1, *}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 26.04.2024 г.

Проведено исследование общей антиоксидантной активности карнозина и карнозиновых динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). В качестве экспериментальной модели использовали систему, содержащую метмиоглобин (metMb) или гемин в сочетании с гидропероксидом *трет*-бутила (*t*-ВООН). С помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции было показано, что карнозин и карнозиновые ДНКЖ эффективно снижали уровень прооксидантов, образующихся при взаимодействии гемовых групп с *t*-ВООН. Кроме того, карнозин и карнозиновые ДНКЖ ингибировали образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе окисления арахидоновой кислоты в системе metMb—*t*-ВООН. В используемых реакционных системах антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ было выше, чем у карнозина. Антиоксидантный эффект карнозина также зависел от присутствия ионов двухвалентного железа, добавленных в концентрации, эквивалентной их содержанию в ДНКЖ. Полученные результаты показали, что включение карнозина в качестве лигандов в нитрозильные комплексы железа усиливало его антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: карнозин, динитрозильные комплексы железа, перекисное окисление, миоглобин, гидропероксид *трет*-бутила, арахидоновая кислота, окислительная модификация

DOI: 10.31857/S0555109924050044 EDN: QTVCXS

Карнозин (β-аланил-L-гистидин) — наиболее хорошо изученный гистидиновый дипептид (имидазолсодержащий дипептид), который синтезируется у многих позвоночных организмов. Гистидиновые дипептиды продуцируются в различных органах и тканях, причем их концентрация и состав варьируют в широких пределах [1]. Так, в высоких концентрациях карнозин содержится в сердечных и скелетных мышцах [2]. Также он обнаружен в мозге, в тканях пищеварительной системы и в почках. Для этого дипептида описано множество физиологических функций [1, 3]. Он поддерживает рН в скелетных мышцах, продуцирующих высокие уровни молочной кислоты во время анаэробного гликолиза [4]. В нейронах обонятельных рецепторов карнозин может играть роль нейромодулятора [5, 6]. Также известно, что карнозин регулирует ферменты энергетического обмена: фруктозо-1,6-бисфосфатазу (КФ 3.1.3.11) и фосфорилазы *a* и *b* (две формы гликогенфосфорилазы, КФ 2.4.1.1) [7]. В дополнение к этим функциям

карнозин известен как потенциальный антиоксидант и антигликирующий агент [1, 3, 8, 9].

Карнозин является хорошим хелатором ионов железа, меди и цинка, удаляет активные формы кислорода и азота, образует аддукты с токсичными электрофильными α,β-ненасыщенными альдегидами [8, 10, 11]. Благодаря этим свойствам карнозин может защищать клетки от окислительного повреждения и замедлять их старение [12, 13]. В настоящее время на основе карнозина производят терапевтические средства (биологически активные добавки) для повышения работоспособности при физических нагрузках, замедления старения, иммуномодуляции, для профилактики и лечения диабета, а также неврологических расстройств [6, 13].

Карнозин является потенциальным терапевтическим средством при сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях, сахарном диабете второго типа, нейродегенеративных расстройствах [3, 12, 14, 15]. Имеются доказательства защиты карнозином нейронов при ишемии/реперфузии [6, 16].

Считается, что основной механизм такого действия карнозина связан с металлохелатирующей способностью, поскольку именно ионы металлов являются частой причиной нейродегенеративных процессов [12, 17]. Кроме этого, было продемонстрировано антифиброзное действие этого дипептида [18]. Много работ посвящено изучению противоопухолевой активности карнозина. По данным доклинических исследований, карнозин уменьшает размер раковых клеток и их жизнеспособность [19].

Для повышения устойчивости карнозина к действию гидролизующего фермента карнозиназы (аминоацил-гистидиндипептидаза, КФ 3.4.13.3) его различными способами модифицируют, например, получают ОН- или NH-связанные конъюгаты с циклодекстрином и гиалуроновой кислотой [20, 21]. Комплексы карнозина, конъюгированного гиалуроновой кислотой, с ионами Cu^{2+} имитировали действие Cu, Zn-супероксиддисмутазы (SOD1, КФ 1.15.1.1) [21].

Ведутся исследования по созданию на основе карнозина соединений с терапевтическим потенциалом, которые совмещают полезную функцию пептида и конъюгирующего фрагмента. К таким соединениям относят аналоги карнозина, способные выступать в качестве доноров оксида азота (NO^{\cdot}) [22]. Карнозидами, содержащими NO-донорные группы, интересны как терапевтическое средство для лечения широкого спектра хронических сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, при которых биодоступность NO^{\cdot} снижена. Эти соединения защищают от ишемии/реперфузии *in vivo*, обладают антиоксидантной активностью *in vitro*, а также вазодилаторным действием на фрагментах аорты крысы [22].

Кроме того, к NO-донорным физиологическим производным карнозина можно отнести динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), в которых карнозин является лигандом. “Карнозиновые” ДНКЖ были получены ранее в работе [23]. На модельной системе, содержащей гидропероксид *трет*-бутила, были получены данные о наличии у этих комплексов антиоксидантных и антирадикальных свойств [24].

Цель настоящей работы – более детально изучить антиоксидантное и антирадикальное действие карнозиновых ДНКЖ в условиях, моделирующих перекисное окисление в живых системах.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: гемин, метмиоглобин из скелетных мышц кашалота, *L*-карнозин (в дальнейшем будем называть его просто “карнозин”), 5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-галазидион (люминол), гидропероксид *трет*-бутила (*t*-ВООН), арахидоновая кислота,

HEPES, NaNO_2 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 – все реактивы “Sigma-Aldrich” (США).

ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ- PO_4^-) синтезировали, как описано в работе [25], пропускаемая в сосуде Тунберга газообразный NO^{\cdot} через раствор FeSO_4 (5 мМ) в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7.0). В результате возникали ДНКЖ, включавшие в себя все введенное железо, NO и анионы фосфата в качестве лигандов. ДНКЖ, связанные с карнозином, получали, добавляя ДНКЖ- PO_4^- к раствору карнозина в молярном соотношении 1 : 2. Образование этих комплексов контролировали с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). На рис. 1 приведены характерные спектры ЭПР фосфатных и карнозиновых ДНКЖ.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре (25°C) на спектрометре E109E фирмы “Varian” (США). Объем образца, который помещали в резонатор спектрометра – 80 мкл. Образцы перед измерением помещали в газопроницаемые тефлоновые капилляры PTFE 22 (“Zeus Industrial Products”, США). Условия регистрации: СВЧ мощность 10 мВт, СВ частота 9.15 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0.1 мГл. Спектры карнозиновых ДНКЖ записывали через 8 мин после смешивания фосфатных ДНКЖ и карнозина в конечной концентрации 4 и 8 мМ соответственно.

Измерение диеновых конъюгатов арахидоновой кислоты. Диеновые конъюгаты – первичные продукты окисления арахидоновой кислоты, индуцированного реакцией metMb с *t*-ВООН, измеряли по величине оптического поглощения при 234 нм. Реакционная смесь содержала 3.3 мМ арахидоновой кислоты, 0.02 мМ миоглобина, 0.06 мМ *t*-ВООН, *L*-карнозин или карнозиновые ДНКЖ в 60 мМ К-фосфатном буфере (рН 7.4). Конечная концентрация как свободного, так и связанного в комплексах карнозина была 0.1 или 1.0 мМ в разных вариантах опытов, ДНКЖ, соответственно, в два раза меньше – 0.05 и 0.5 мМ. FeSO_4 во всех экспериментах добавляли до концентрации, эквивалентной содержанию железа в ДНКЖ. Кинетику образования диеновых конъюгатов регистрировали в течение 80 мин при 37°C.

Люминол-зависимая хемилюминесценция. Образование прооксидантов в реакции metMb или гемина с *t*-ВООН оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (“DISoft”, Россия). Время от смешения всех компонентов реакционной смеси до регистрации хемилюминесценции не превышало 3 с. Регистрацию кинетики продолжали при постоянном перемешивании и термостатировании при 37°C. Для количественной оценки хемилюминесценции

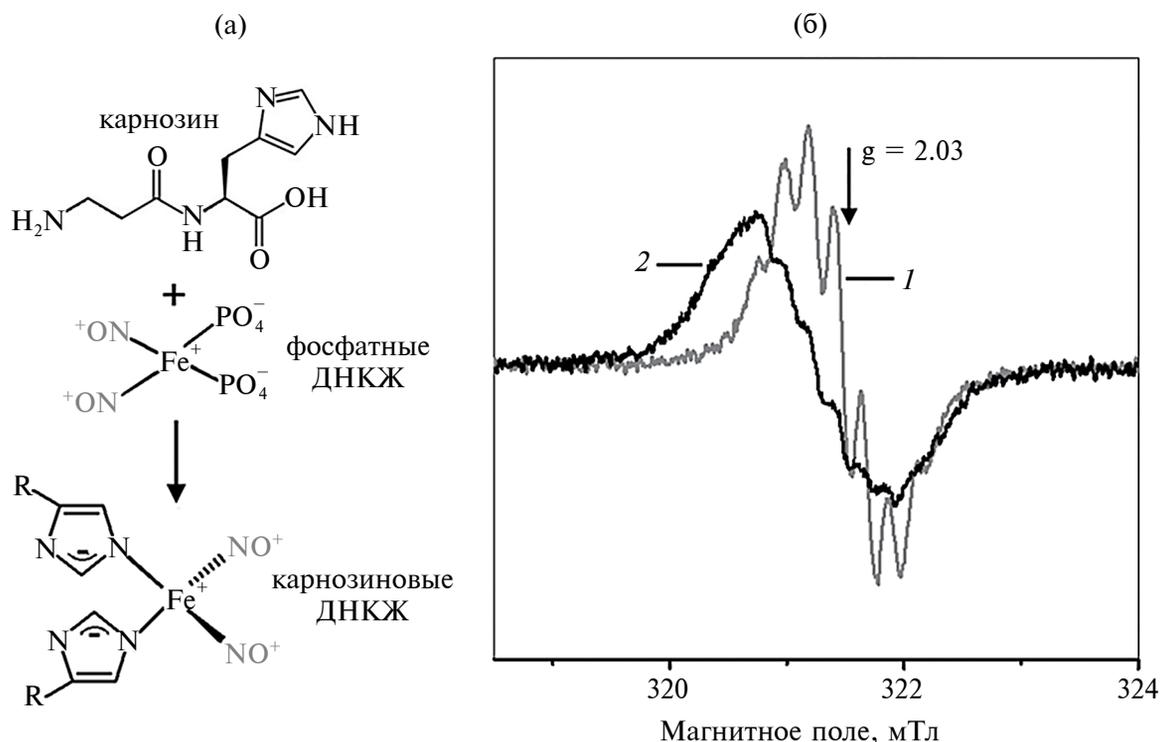
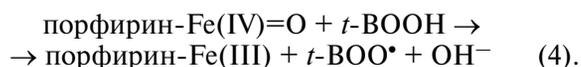
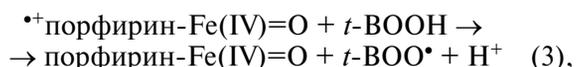
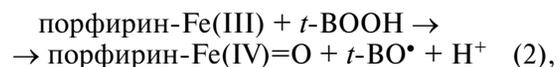
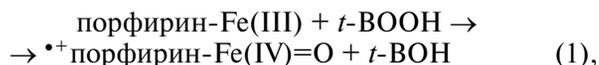


Рис. 1. Превращение ДНКЖ с фосфатными лигандами в карнозиновые ДНКЖ: а – схема образования карнозиновых ДНКЖ при замещении фосфатных лигандов комплексов карнозином; б – спектры ЭПР фосфатных (1) и карнозиновых (2) ДНКЖ.

использовали ее светосумму в течение 2500 с. Светосумму рассчитывали по площади под кинетической кривой. Состав реакционной среды был следующий: 0.02 мМ metMb в 60 мМ фосфатном буфере (рН 7.4), 2 мМ люминола, 0.06 мМ *t*-BOOH. Карнозин, в том числе в составе ДНКЖ, добавляли до конечных концентраций 0.1 или 1 мМ. Концентрация самих ДНКЖ и FeSO₄ составляла 0.05 и 0.5 мМ соответственно, поскольку в комплексе железо координировано с двумя карнозиновыми лигандами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие карнозина и карнозиновых ДНКЖ с прооксидантами, образующимися в реакциях между гемом и гидропероксидом *трет*-бутила. Известно, что взаимодействие гемовых групп с различными гидропероксидами играет важную роль в развитии окислительного стресса [26–28]. В мышечной ткани в таких реакциях может участвовать миоглобин, что может приводить к развитию рабдомиолиза. Антиоксидантное действие карнозина и карнозиновых ДНКЖ изучали в модельной системе, содержащей метмиоглобин и гидропероксид *трет*-бутила (metMb—*t*-BOOH). Считается, что в этих условиях протекают следующие реакции [24, 26]:



В этих реакциях продуцируются такие прооксиданты, как свободные радикалы – производные *t*-BOOH (*t*-BO•, *t*-BOO•), а также перферрильная (\bullet^+ порфирин-Fe(IV)=O) и оксоферрильная (порфирин-Fe(IV)=O) формы гемовой группы.

В наших экспериментах продукцию свободных радикалов и других прооксидантов регистрировали методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Конечная концентрация как свободного, так и связанного с ДНКЖ карнозина составляла 0.1 (рис. 2а, 2в) или 1 мМ (рис. 2б, 2г), концентрация самих ДНКЖ и FeSO₄ в образцах была 0.05 или 0.5 мМ соответственно. Представленные на рис. 2 данные показывают, что карнозин и карнозиновые ДНКЖ в значительной степени снижали уровень прооксидантов в исследуемой системе (рис. 2а и 2б, кривые 3 и 5), причем антиоксидантный эффект

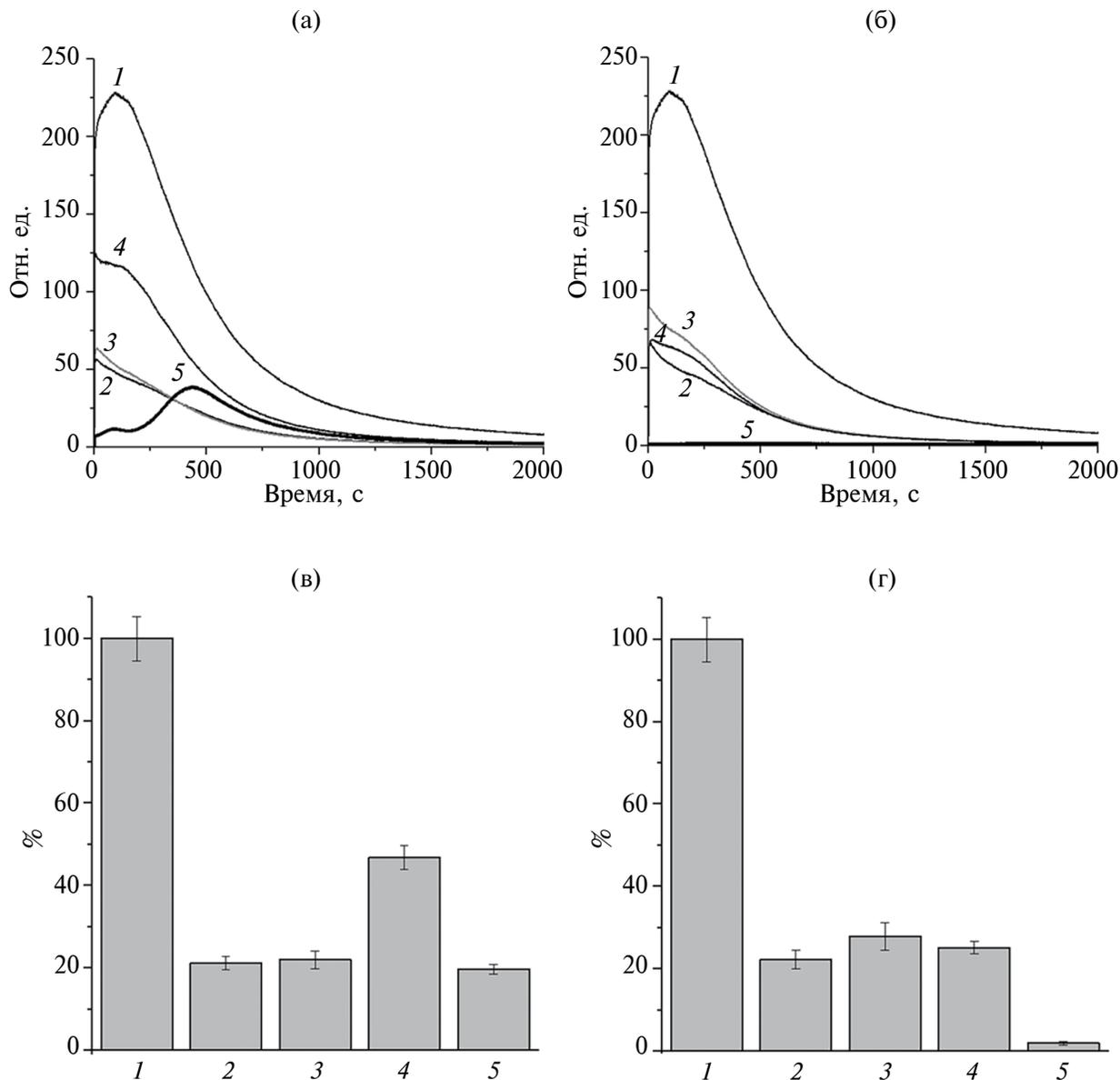


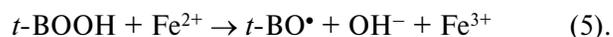
Рис. 2. Влияние карнозина, карнозиновых ДНКЖ и Fe^{2+} на кинетику (а, б) и светосумму (в, г) люминол-зависимой хемилюминесценции (%). За 100% принята светосумма в контрольном образце. Контроль – реакционная смесь без добавок (1), с добавлением: FeSO_4 (2), карнозина (3), карнозина + FeSO_4 (4), карнозиновых ДНКЖ (5).

ДНКЖ превосходил таковой карнозина. Это видно как по снижению максимума выхода хемилюминесценции в присутствии комплексов, так и по смещению кривой вправо (рис. 2а и 2б, кривая 5), то есть появлению выраженной лаг-фазы на этой кривой. При концентрации 1 мМ карнозиновые ДНКЖ полностью подавляли хемилюминесценцию (рис. 2б, кривая 5).

Полученные результаты также представлены в виде светосуммы хемилюминесценции (рис. 2в и 2г). Добавление 0.1 мМ карнозина совместно с ионами Fe^{2+} приводило к уменьшению светосуммы хемилюминесценции на 55% в отличие от 80%-ного снижения при добавлении карнозина и карнозиновых

ДНКЖ (рис. 2в). Карнозиновые ДНКЖ в концентрации 0.5 мМ (1 мМ по карнозину) уменьшают светосумму на 96% (рис. 2г, столбец 5).

Ионы Fe^{2+} добавляли для индукции реакции Фентоновского типа, в которой также продуцируются алкоксильные радикалы:



Нужно отметить, что в реакционной смеси с ДНКЖ ионы железа могут высвобождаются в ходе распада этих комплексов. Однако в экспериментах ионы Fe^{2+} ингибировали люминол-зависимую хемилюминесценцию в реакционной системе

metMb—*t*-VOOH (рис. 2). Действительно, имеются исследования, в которых показано, что Fe^{2+} может восстанавливать радикалы *t*-VO• [29] и в определенных концентрациях действовать как антиоксидант [30].

Данные, представленные на рис. 3, показывают, что при замене metMb гемом карнозин и карнозиновые ДНКЖ также ингибируют хемилюминесценцию, что указывает на их способность перехватывать прооксиданты, образующиеся в реакциях 1–4 при участии свободного гема. Карнозиновые ДНКЖ, как и в системе metMb—*t*-VOOH, были эффективнее свободного карнозина (рис. 3а и 3б, кривые 3 и 5). Следует отметить, что в большинстве экспериментов интенсивность хемилюминесценции в системе metMb — *t*-VOOH была заметно выше, чем в системе с гемом. Вместе с тем, в отличие от системы с metMb, добавление ионов Fe^{2+} к системе гемин — *t*-VOOH приводило к росту интенсивности хемилюминесценции (рис. 3а и 3б, кривые 2). Как и в экспериментах с metMb, конечная концентрация как свободного, так и связанного с ДНКЖ карнозина составляла 0.1 (рис. 3а) или 1 мМ (рис. 3б); концентрация ДНКЖ и $FeSO_4$ в образцах была 0.05 или 0.5 мМ соответственно.

Наряду с реакциями 1–4 в системе metMb—*t*-VOOH происходит одноэлектронное окисление аминокислотных остатков метмиоглобина перферрильной и оксоферрильной формами гема [27, 28]. В этих условиях образуются ассоциированные с белковой цепью свободные радикалы, которые, по-видимому, вносят существенный вклад в люминол-зависимую хемилюминесценцию. Можно предположить, что Fe^{2+} восстанавливает такие свободные

радикалы, с чем и связано его антиоксидантное действие в системе metMb—*t*-VOOH. С другой стороны, в системе с гемом свободные ионы Fe^{2+} проявляют прооксидантные свойства. С высказанным предположением согласуется тот факт, что карнозин как хелатор ионов железа, влияет на эти процессы. Так, введение в систему гемин—*t*-VOOH совместно с Fe^{2+} карнозина ингибировало хемилюминесценцию (рис. 3а и 3б, кривые 4), тогда как в аналогичном эксперименте в системе metMb — *t*-VOOH, напротив, происходит ее усиление (рис. 2а, 2в). Существенно, что эти эффекты наблюдались при концентрациях карнозина и Fe^{2+} 0.1 и 0.05 мМ соответственно. В присутствии высоких концентраций карнозина и Fe^{2+} в обоих реакционных системах ингибирование хемилюминесценции было почти таким же, как и при действии одного карнозина.

Влияние карнозина и карнозиновых ДНКЖ на перекисное окисление арахидоновой кислоты. Способность карнозина ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) была показана в различных модельных системах [11, 31]. В предыдущих работах было показано, что глутатионовые ДНКЖ также ингибируют ПОЛ [32]. Основываясь на этих фактах, было проведено сравнительное изучение действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ на окисление арахидоновой кислоты (омега-6-ненасыщенная жирная кислота), индуцированное прооксидантами, образующимися в реакции metMb с *t*-VOOH. В литературе описаны сходные модельные системы ПОЛ, содержавшие арахидоновую кислоту, metMb и пероксид водорода [28]. На рис. 4 представлена схема цепных реакций перекисного окисления арахидоновой кислоты.

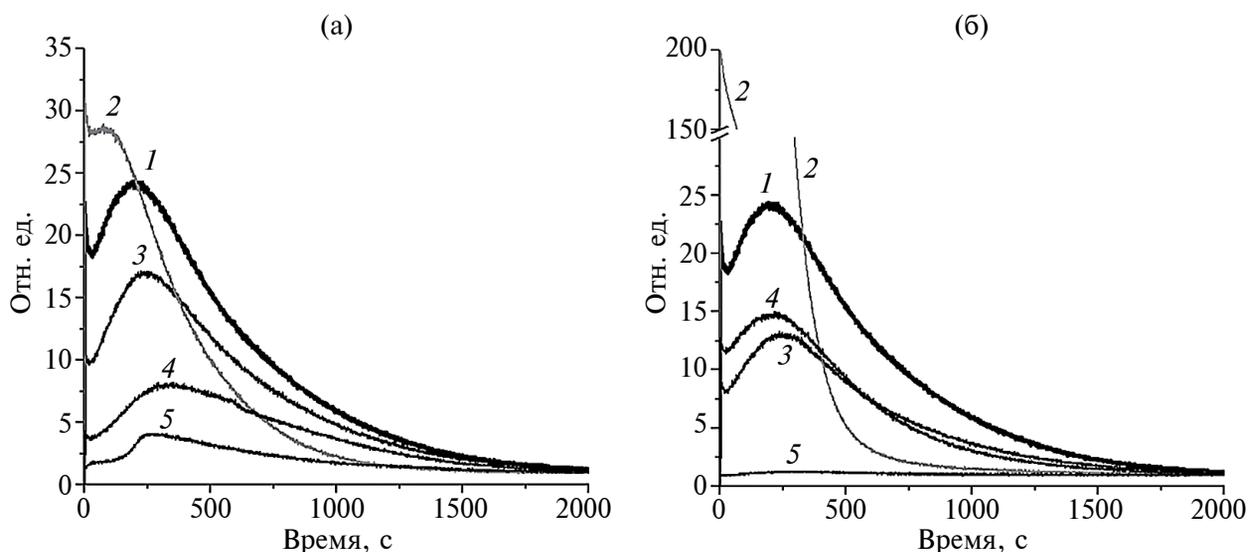


Рис. 3. Влияние карнозина, карнозиновых ДНКЖ и ионов Fe^{2+} на кинетику люминол-зависимой хемилюминесценции (отн. ед.) в системе гемин — *t*-VOOH при различных концентрациях связанного в комплексах карнозина 0.1 (а) или 1 мМ (б). 1 — контроль, реакционная смесь без добавок; 2 — (1) + $FeSO_4$; 3 — (1) + карнозин; 4 — (1) + карнозин + $FeSO_4$; 5 — (1) + карнозиновые ДНКЖ.

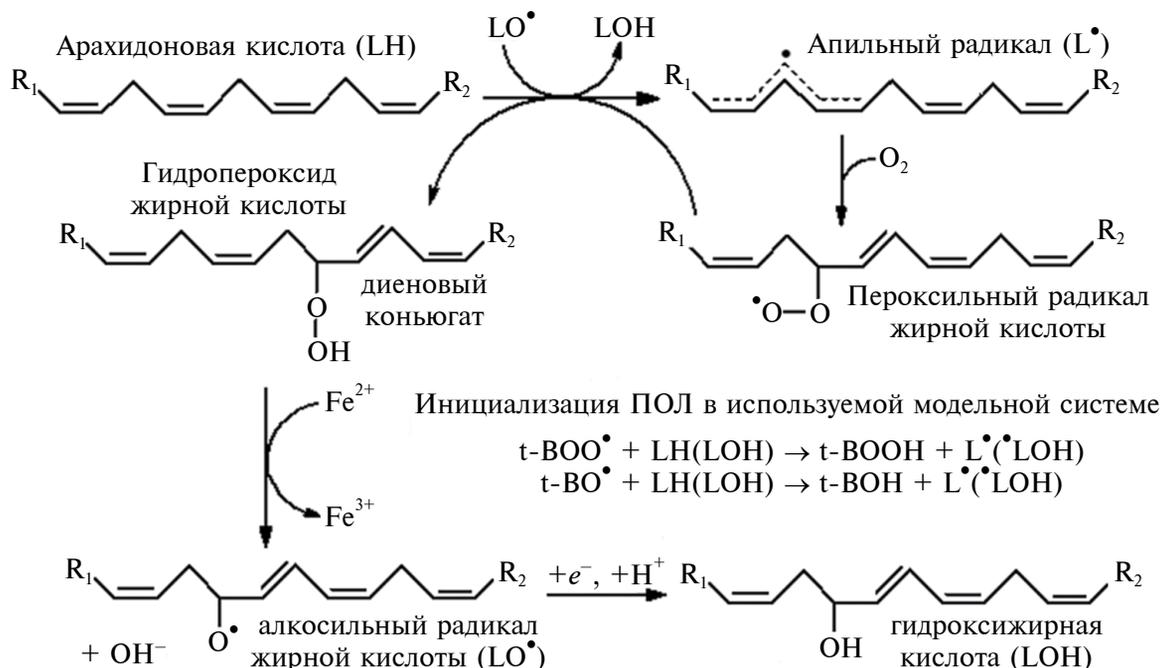


Рис. 4. Схема реакций свободнорадикального перекисного окисления арахидоновой кислоты в системе metMb-t-BOOH .

Регистрировали первичные продукты ПОЛ — диеновые конъюгаты, которые являются гидропероксидами липидов с сопряженными двойными связями. Как уже отмечалось, карнозиновые ДНКЖ могут быть источниками ионов Fe^{2+} , которые участвуют в реакциях разветвления цепи ПОЛ (рис. 4). Эта реакция аналогична реакции 5 и приводит к образованию алкоксильного радикала жирной кислоты (LO^\bullet). В связи с этим, были поставлены эксперименты с карнозином и ионами Fe^{2+} , добавленными в концентрации, эквивалентной содержанию железа в ДНКЖ.

Вначале было исследовано действие различных концентраций карнозина и карнозиновых ДНКЖ. Комплексы, добавленные в концентрации 0.1 мМ, практически полностью (на 95%) подавляли образование первичных продуктов ПОЛ (рис. 5а). В то же время ингибирующий эффект карнозина составлял 65%, а в сочетании с ионами железа — 55%. При концентрации карнозина и карнозиновых лигандов ДНКЖ, равной 1 мМ (концентрация ДНКЖ 0.5 мМ), образование диеновых конъюгатов снижалось примерно на 80 % (рис. 5а). На рис. 5б приведены кинетики накопления диеновых конъюгатов в реакционной смеси. Видно, что в присутствии исследуемых соединений уровень первичных продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот перестал расти через 15 мин, в контрольном образце их накопление продолжалось около 80 мин.

На рис. 6 представлены данные о начальной скорости образования диеновых конъюгатов.

Наименьшая скорость была в образцах, содержащих карнозиновые ДНКЖ (примерно в 10 раз меньше, чем в контроле). Карнозин также достаточно эффективно снижал начальную скорость формирования первичных продуктов ПОЛ (рис. 6, 3), тогда как при сочетании карнозина с Fe^{2+} скорость была такая же, как и в контроле (рис. 6, 4). Эти данные коррелируют с уровнем диеновых конъюгатов, образованных к 80 мин реакции. Добавка Fe^{2+} к контрольному образцу увеличивала скорость реакции окисления арахидоновой кислоты на 30% (рис. 6, 2), что подтвердило участие ионов железа в качестве инициаторов ПОЛ в исследуемой системе (рис. 4). Как видно из представленных данных, проокислительный эффект Fe^{2+} снижается как при сочетании его с карнозином, так и при включении в состав ДНКЖ.

Исследование антиоксидантной функции гистиновых дипептидов началось еще в 1980 гг. XX века. За время этих исследований было показано, что гистиновые дипептиды перехватывают супероксидные анион-радикалы ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [10], гидроксильный радикал (HO^\bullet) [33], пероксильные радикалы [11, 31], активные производные оксида азота [34], в том числе пероксинитрит (ONOO^-) [35] и хлорноватистую кислоту (HClO) [36]. Однако по антиоксидантной активности гистиновые дипептиды уступают таким эндогенным водорастворимым антиоксидантам, как глутатион и аскорбат [8].

Интересные результаты были получены при изучении окисленного производного карнозина — 2-оксо-карнозина. По антиоксидантной

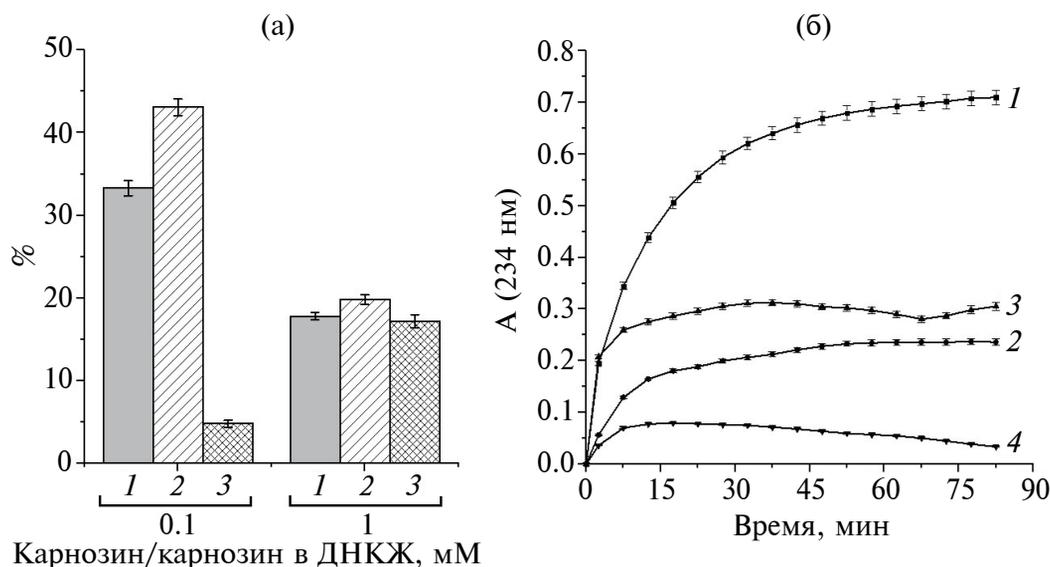


Рис. 5. Образование диеновых конъюгатов в ходе окисления арахидоновой кислоты (3.3 мМ) в системе metMb—*t*-ВООН: а — влияние различных концентраций карнозина (1), карнозина + Fe²⁺ (2) и карнозиновых ДНКЖ (3) на уровень диеновых конъюгатов, образовавшихся за 80 мин реакции (за 100 % принимали уровень в контроле); б — кинетики накопления диеновых конъюгатов в смеси с карнозином, карнозиновыми ДНКЖ и Fe²⁺; контроль, смесь без добавок (1), с добавлением: карнозина (2), FeSO₄ (3), карнозиновых ДНКЖ (4).

активности 2-оксо-карнозин оказался значительно эффективнее глутатиона, аскорбата и самого карнозина [2, 37]. Аналогичная модификация других гистидиновых дипептидов (гомокарнозина и ансерина) также усиливала их антиоксидантные свойства.

Антиоксидантные свойства гистидиновых дипептидов, помимо улавливания свободных радикалов, также могут быть обусловлены способностью имидазольного кольца дипептида связывать ионы редокс-активных металлов [10, 11]. Однако механизмы антиоксидантного действия гистидиновых дипептидов до конца не выяснены. В связи с этим особый интерес представляют ДНКЖ, в лигандную сферу которых входит карнозин [23]. Проведенное ранее изучение антиоксидантной активности карнозиновых ДНКЖ выявило, что эти комплексы перехватывают свободные радикалы, возникающие при распаде *t*-ВООН, и супероксидный анион-радикал, образующийся в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза [24]. Также показано, что они восстанавливают оксоферрильную форму гемовой группы миоглобина.

Одним из возможных объяснений антиоксидантных свойств ДНКЖ в реакционных системах, содержащих гидропероксид *трет*-бутила, metMb или гемин, может быть взаимодействие этих комплексов с оксоферрильной и перферрильной формами гема.

Для тестирования антиоксидантного действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ мы использовали систему перекисного окисления

арахидоновой кислоты, индуцируемую продуктами реакции миоглобина с органической гидроперекисью. Это было обусловлено как физиологической важностью, так и высоким содержанием арахидоновой кислоты (в скелетных мышцах она составляет 15–17% от всех жирных кислот). Кроме того, она входит в состав фосфолипидов плазматических мембран, а нитроарахидоновая

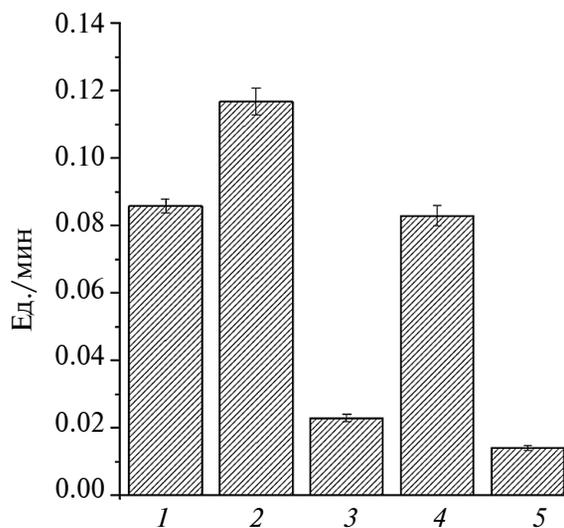


Рис. 6. Начальная скорость образования диеновых конъюгатов (ед./мин) в ходе окисления арахидоновой кислоты в системе metMb — *t*-ВООН. Контроль, реакционная смесь без добавок (1), с добавлением: FeSO₄ (2), карнозина (3), карнозина + FeSO₄ (4), карнозиновых ДНКЖ (5).

кислота, образующаяся в реакции алкилперекисного радикала с оксидом азота (см. реакцию 9), обладает сигнальным действием. Карнозин и миоглобин также содержатся в мышцах в большом количестве.

Было показано антиоксидантное действие как карнозина, так и карнозиновых ДНКЖ в данной системе, причем карнозиновые ДНКЖ оказались более эффективными антиоксидантами, чем карнозин. Также была установлена зависимость антиоксидантного эффекта (подавление образования диеновых конъюгатов) от концентрации исследуемых соединений (рис. 5а). С увеличением концентрации, антиоксидантное действие карнозина возрастало, а у комплексов, наоборот, снижалось. Это может быть связано с высвобождением при распаде ДНКЖ ионов Fe^{2+} , участвующих в генерации свободных радикалов (реакция 5 и реакция разветвления цепи ПОЛ на рис. 4). Хорошо известно, что в системах, моделирующих ПОЛ, ионы Fe^{2+} в низких концентрациях (менее 50 мкМ) проявляют прооксидантные свойства, а при более высоких концентрациях — ингибируют процессы свободно-радикального окисления [30], что согласовывалось с полученными нами данными.

Обнаруженное в присутствии Fe^{2+} в реакционной смеси подавление люминол-зависимой хемилюминесценции карнозином (рис. 3а, 3б) согласовывалось с результатами работы [38], в которой было показано, что карнозин обладал значительной антиоксидантной активностью, особенно в присутствии ионов переходных металлов.

Антиоксидантные свойства карнозиновых ДНКЖ могут быть обусловлены комплексным действием трех составляющих: 1) карнозиновыми лигандами, 2) оксидом азота, 3) ионами Fe^{2+} . Антиоксидантное действие карнозина было неоднократно показано [9–11, 15, 31, 36]. Есть данные, что активным элементом дипептида является имидазольное кольцо гистидина [39]. Также существенный вклад вносит способность карнозина хелатировать Fe^{2+} и Cu^{2+} [10, 11]. Антиоксидантное действие $NO\cdot$ в реакциях ПОЛ показано в различных системах *in vitro* и *in vivo* [29, 40, 41]. Ранее также неоднократно были описаны возможные механизмы антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ с различными природными лигандами [25, 32, 42]. Так, свободный $NO\cdot$ и NO -лиганды ДНКЖ могут обрывать цепные реакции ПОЛ. Нельзя исключить, что карнозиновые ДНКЖ являются донорами нитроксила (HNO), который также является эффективным антиоксидантом [43, 44]. Известно, что ДНКЖ с азотсодержащим гетероциклическим лигандом 3-метилпиразолом спонтанно высвобождают HNO [45]. Способность $NO\cdot$ и HNO ингибировать ПОЛ можно описать следующими реакциями:



где $LO\cdot$ — алкоксильный радикал липида, $LOO\cdot$ — пероксильный радикал липида, $LONO$ и $LONO_2$ — нитролипиды, $LOONO$ — органический пероксинитрит.

Наконец, в случае карнозиновых ДНКЖ можно предположить еще один дополнительный механизм, связанный с окислением гистидина реакционно-активными интермедиатами, возникающими внутри комплексов при взаимодействии NO -лигандов с кислородом и некоторыми свободными радикалами [32, 46]. Как уже отмечалось выше, в ходе окисления имидазольного кольца карнозина образуется 2-оксогистидин, обладающий высокой антиоксидантной активностью [47].

Высокая концентрация карнозина в тканях с активным окислительным метаболизмом (мышцы и мозг) позволяет предположить, что одна из функций этого дипептида связана с ингибированием свободнорадикальных реакций [10, 12]. Так, показано, что карнозин, гомокарнозин и анзерин замедляют дегенеративные процессы, запускаемые свободными радикалами.

В заключение следует отметить, что наличие антиоксидантной функции у гистидиновых дипептидов послужило предпосылкой для их использования в лечении и профилактики различных заболеваний, связанных с окислительным и карбонильным стрессом (нейродегенеративные и онкологические заболевания, диабет, катаракта) [1, 3, 6, 8, 12]. Полученные в данной работе результаты могут быть полезны для понимания биохимической роли гистидиновых дипептидов. Так, обнаруженное антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ предполагает существование новых механизмов, посредством которых этот дипептид влияет на окислительную модификацию и свободно-радикальное окисление биомолекул в живых системах. В данном случае можно говорить о том, что имидазол карнозина и NO -лиганд ДНКЖ взаимно усиливают антиоксидантное действие комплекса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. P. 1803–1845.
2. *Ihara H., Kakihana Y., Yamakage A., Kai K., Shibata T., Nishida M., Yamada K.I., Uchida K.* // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. P. 1279–1289.
3. *Caruso G., Pietro L.D., Cardaci V., Maugeri S., Caraci F.* // *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 2023. V. 4. e100153.
<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2023.100153>
4. *Abe H.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 757–765.
5. *De Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F.L., Fasolo A.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 824–833.
6. *Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I. et al.* // *Amino Acids*. 2019. V. 51. № 1. P. 139–150.
7. *Ikeda T., Kimura K., Hama T., Tamaki N.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 87. P. 179–185.
8. *Abdelkader H., Longman M., Alany R.G., Pierscionek B.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e3240261.
<https://doi.org/10.1155/2016/3240261>
9. *Malathy D., Anusha D., Karthika K., Punnaigai K.* // *J. Clin. Diagn. Res.* 2023. V. 17. № 7. P. FC01–FC05.
10. *Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Lyubitsky O.B., Rebrova O.Yu., Boldyrev A.A., Vladimirov Yu.A.* // *Membr. Cell Biol.* 1998. V. 12. № 1. P. 89–99.
11. *Decker E.A., Livisay S.A., Zhou S.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 766–770.
12. *Banerjee S., Poddar M.K.* // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2020. V. 91. e104239.
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104239>
13. *Babizhayev M.A., Yegorov Y.E.* // *Recent. Pat. Drug. Deliv. Formul.* 2015. V. 9. № 1. P. 1–64.
14. *Menini S., Iacobini C., Fantauzzi C.B., Pugliese G.* // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. № 11. P. 1744–1763.
15. *Solana-Manrique C., Sanz F.J., Martínez-Carrión G., Paricio N.* // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 5. e848.
<https://doi.org/10.3390/antiox11050848>
16. *Tabakman R., Lazarovici P., Kohen R.* // *J. Neurosci. Res.* 2002. V. 68. P. 463–469.
17. *Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Yakunin S.N., Topunov A.F.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2024. V. 89. Suppl. 1. P. S180–S204.
18. *Berdaweel I.A., Monroe T.B., Alowaisi A.A., Mahoney J.C., Liang I.-C., Berns K.A., et al.* // *Front. Pharmacol.* 2024. V. 14. e1275388.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1275388>
19. *Maugeri S., Sibbitts J., Privitera A., Cardaci V., Di Pietro L., Leggio L. et al.* // *Cells*. 2023. V. 12. № 22. e2592.
<https://doi.org/10.3390/cells12222592>
20. *Bellia F., Amorini A.M., La Mendola D., Vecchio G., Tavazzi B., Giardina B., et al.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2008. V. 43. № 2. P. 373–380.
21. *Bellia F., Lanza V., Naletova I., Tomasello B., Ciaffaglione V., Greco V. et al.* // *Antioxidants*. 2023. V. 12. № 8. e1632.
<https://doi.org/10.3390/antiox12081632>
22. *Bertinaria M., Rolando B., Giorgis M., Montanaro G., Marini E., Collino M., Benetti E., Daniele P.G., Fruttero R., Gasco A.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 54. P. 103–112.
23. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017. V. 22. № 1. P. 153–160.
24. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 24. e17236.
<https://doi.org/10.3390/ijms242417236>
25. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F.* // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 445–461.
26. *Kagan V.E., Kozlov A.V., Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Yalowich J.C.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2001. V. 3. № 2. P. 189–202.
27. *Reeder B.J., Svistunenko D.A., Cooper C.E., Wilson M.T.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. V. 6. № 6. P. 954–966.
28. *Wilson M.T., Reeder B.J.* // *Molecular Aspects of Medicine*. 2022. V. 84. e101045.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101045>
29. *Mihaljević B., Ražem D.* // *Radiation Physics and Chemistry*. 2003. V. 67. № 3–4. P. 269–274.
30. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В.* // *Успехи биологической химии*. 2009. Т. 49. С. 341–388.
31. *Kang J.H., Kim K.S., Choi S.Y., Kwon H.Y., Won M.H., Kang T.C.* // *Mol. Cells*. 2002. V. 13. № 3. P. 498–502.
32. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K.* // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. V. 15. № 4. P. 313–319.
33. *Tamba M., Torreggiani A.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1999. V. 75. P. 1177–1188.
34. *Nicoletti V.G., Santoro A.M., Grasso G., Vagliasindi L.I., Giuffrida M.L., Cuppari C., et al.* // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. № 10. P. 2239–2245.
35. *Fontana M., Pinnen F., Lucente G., Pecci L.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. V. 59. № 3. P. 546–551.
36. *Pattison D.I., Davies M.J.* // *Biochemistry*. 2006. V. 45. № 26. P. 8152–8162.
37. *Kasamatsu S., Komae S., Matsukura K., Kakihana Y., Uchida K., Ihara H.* // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 9. e1434.
<https://doi.org/10.3390/antiox10091434>
38. *Mozdzan M., Szemraj J., Rysz J., Nowak D.* // *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.* 2005. T. 96. № 5. P. 352–360.

39. Peiretti G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G. // *Food Chemistry*. 2011. V. 126. № 4. P. 1939–1947.
40. Gorbunov N.V., Tyurina Y.Y., Salama G., Day B.W., Claycamp H.G., Argyros G., Elsayed N.M., Kagan V.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 3. P. 647–651.
41. Hummel S.G., Fischer A.J., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. № 3. P. 501–506.
42. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 24. e13649. <https://doi.org/10.3390/ijms222413649>
43. Shoman M.E., Aly O.M. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e4018417. <https://doi.org/10.1155/2016/4018417>
44. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 10. e2007. <https://doi.org/10.3390/antiox11102007>
45. Tseng Y.-T., Chen C.-H., Lin J.-Y., Li B.-H., Lu Y.-H., Lin C.-H., et al. // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. P. 17570–17573.
46. Lu S., Chiou T.-W., Li W.-L., Wang C.-C., Wang Y.-M. et al. // *Inorg. Chem.* 2020. V. 59. № 12 P. 8308–8319.
47. Uchida K. // *Amino Acids*. 2003. V. 25. P. 249–257.

Antioxidant Effect of Carnosine and Carnosine Dinitrosyl Iron Complexes at the Conditions Modeling Peroxidation of Biomolecules

E. I. Nasybullina^a, O. V. Kosmachevskaya^a, K. B. Shumaev^a, and A. F. Topunov^{a, *}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: aftopunov@yandex.ru*

The antioxidant activity of carnosine and of carnosine dinitrosyl iron complexes (DNICs) was studied. A system with metmyoglobin (metMb) or gemin in combination with *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH) was used as experimental model. Using luminol-dependent chemiluminescence method, it was shown that carnosine and carnosine DNICs effectively diminished the level of prooxidants formed by the interaction of heme groups with t-BOOH. In addition, carnosine and carnosine DNICs inhibited formation of diene conjugates arising during the oxidation of arachidonic acid in metMb—t-BOOH system. In used reaction systems, antioxidant effect of carnosine DNICs was higher than that of carnosine. Antioxidant effect of carnosine also depended on the presence of bivalent iron ions added at the concentration equivalent to their content in DNICs. These results show that the insertion of carnosine as a ligand to nitrosyl iron complexes enhances its antioxidant properties.

Keywords: carnosine, dinitrosyl iron complexes, peroxidation, myoglobin, *tert*-butyl hydroperoxide, arachidonic acid, oxidative modification