

УДК 546.172.6:661.982

ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА И ГИДРОПЕРОКСИДА *трет*-БУТИЛА НА ТИОЛОВЫЕ ЛИГАНДЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2023 г. И. С. Пугаченко¹, Э. И. Насыбуллина¹, О. В. Космачевская¹,
К. Б. Шумаев¹, А. Ф. Топунов¹, *

¹ Институт 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 07.04.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Низкомолекулярные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами являются физиологической формой депонирования и транспорта оксида азота (NO) в организме, при этом ДНКЖ могут проявлять антиоксидантные и антирадикальные свойства. Показано, что ДНКЖ, содержащие в качестве лигандов цистеин, глутатион и липоевую кислоту, снижали скорость окисления дигидрорадамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции 3-морфолиносиднонимина. Тиоловые (сульфгидрильные) лиганды входят в состав ДНКЖ в форме тиолат-анионов ($R-S^-$), что защищает эти группы от окисления пероксинитритом. При использовании в качестве окислителя гидропероксида *трет*-бутила в низкой концентрации, защитное действие ДНКЖ на SH-группы в их составе наблюдалось для комплексов с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) и с глутатионом (GS-ДНКЖ). LA-ДНКЖ были более устойчивы к действию окислителей и более эффективными “ловушками” пероксинитрита, чем другие ДНКЖ. ДНКЖ, связанные с бычьим сывороточным альбумином, оказывали незначительное защитное действие на остаток цистеина при окислении пероксинитритом и гидропероксидом *трет*-бутила. Полученные результаты позволяют считать низкомолекулярные ДНКЖ с тиоловыми лигандами ловушками пероксинитрита и протекторами цистеиновых остатков в белках.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, тиолы, пероксид *трет*-бутила, пероксинитрит
DOI: 10.31857/S0555109923050148, **EDN:** NSHBED

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются физиологической формой депонирования и транспорта оксида азота (NO) в живых организмах [1, 2]. ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ) характеризуются формулой $\{(RS^-)_2-Fe^+-(NO^+)_2\}$, и могут быть связаны как с низкомолекулярными соединениями, так и с белками. В качестве лигандов этих комплексов могут выступать такие тиолсодержащие соединения, как глутатион и цистеин [2].

В живых системах RS-ДНКЖ представляют собой “рабочую” форму эндогенного NO. Они оказывают мощное вазодилаторное и гипотензивное действие [3], протекторное действие при экспериментальном инфаркте миокарда [4], при геморрагическом шоке [5], вызывают повышение эластичности эритроцитов [6, 7], а также ускорение заживления кожных ран [8]. Многообразие положительных эффектов RS-ДНКЖ позволяет рассматривать их как основу для создания меди-

цинских препаратов с широкой терапевтической активностью. Уже разработан и прошел клинические испытания гипотензивный препарат “Оксаком”, основой которого является биядерный ДНКЖ с глутатионом [9, 10].

В нашей лаборатории проводятся исследования биохимических свойств глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ). Показано, что они оказывают антиоксидантное действие на белковые и липидные системы при окислительном стрессе [11–15]. Благодаря этому свойству они оказывают также и цитопротекторное действие [4, 16–20]. В частности, GS-ДНКЖ в микромолярных концентрациях эффективно ингибируют лизис эритроцитов, индуцированный HOCl, и удаляют алкоксильные ($RO^\bullet$) и алкилпероксильные ($ROO^\bullet$) радикалы, образующиеся в реакции HOCl с гидропероксидом *трет*-бутила [20]. GS-ДНКЖ оказались более эффективными цитопротекторами и “перехватчиками” некоторых органических свободных

радикалов, чем восстановленный глутатион. В последнее время было показано, что ДНКЖ с глутатионовыми и цистеиновыми лигандами обладают противовирусным действием, в том числе и по отношению к COVID-19 [21]. Протекторное (регуляторное) действие ДНКЖ может быть обусловлено в том числе нейтральными молекулами NO, а цитотоксическое — ионами нитрозония (NO^+), высвобождающимися из комплексов [22, 23].

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена их способностью выступать в биосистемах в качестве доноров NO и NO^+ , которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов. Включению этих малых сигнальных молекул в ДНКЖ обеспечивает их стабилизацию и транспорт внутри и вне клеток и тканей без самопроизвольного высвобождения. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать NO и NO^+ на гем- и тиолсодержащие белки, тем самым влияя на метаболические процессы. RS-ДНКЖ также обеспечивают образование S-нитрозотиолов, являющихся важными медиаторами биологического действия эндогенного NO на тиолсодержащие белки и ферменты [24].

Низкомолекулярные тиолы (цистеин, глутатион и др.) в составе ДНКЖ также могут подвергаться действию окислителей, в результате чего комплексы разрушаются, высвобождая Fe^{2+} . Это затрудняет использование лекарственных форм, содержащих ДНКЖ (препараты для инъекций, ингаляций и т.д.). Такие препараты в организме могут быстро разрушаться, не успев оказать нужного терапевтического действия.

Цель работы — изучение действия органической гидроперекиси — гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH) и пероксинитрита на окисление тиоловых лигандов, входящих в состав низкомолекулярных ДНКЖ (ДНКЖ с глутатионом, цистеином и липоевой кислотой) и белковых — ДНКЖ с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: N-ацетилцистеин (AcCys), липоевая кислота (LA), *t*-BOOH, 3-морфолиносиднонимин (SIN-1), дигидрородамин 123 (DHR123), HEPES, диметилсульфоксид (ДМСО), 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Трис), полиакриламид (ПАА), додецилсульфат Na (ДДС), дитиотреитол (ДТТ), бромфеноловый синий, глицин, глицерин, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaNO_2 — “Sigma-Aldrich” (США); 4-гидроксис-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (4-гидроксис-ТЕМРО) — “Oxis” (США); 3Н-нафтол[2,1-*b*]пиран-5-карбоновая кислота (ThioGlo1) — “Calbiochem” (США); L-глутатион, БСА — “AppliChem” (Гер-

мания); изопропанол, H_2SO_4 , H_2O_2 , FeSO_4 , MnO_2 — “Химмед” (Россия).

Синтез пероксинитрита и динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды. Пероксинитрит (ONOO^-) синтезировали по методике, описанной в работе [25], быстро смешивая охлажденные на льду растворы 1.0 М NaNO_2 и 1.0 М H_2O_2 в 0.3 М серной кислоте, после чего добавляли равный объем 1.4 М NaOH. Избыток H_2O_2 удаляли, добавляя порошкообразный MnO_2 (~1 мг/мл), который затем отделяли фильтрованием. Концентрацию пероксинитрита определяли по характерной полосе поглощения при 302 нм ($\epsilon_{302} = 1.67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

ДНКЖ, содержащие в качестве лигандов фосфатный анион (ДНКЖ- PO_4^-), синтезировали как описано в работах [12, 26], пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор FeSO_4 в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере, pH 6.8.

ДНКЖ с N-ацетилцистеином (AcCys-ДНКЖ) и глутатионом (GS-ДНКЖ) синтезировали по следующей схеме. Сначала получали S-нитрозотиол, добавляя к раствору N-ацетилцистеина или глутатиона в 0.2 М HEPES (pH ~ 8.0) небольшой избыток NaNO_2 (1 : 1.5). Через 10 мин к раствору S-нитрозотиола добавляли FeSO_4 до конечной концентрации ~10.8 мМ и далее доводили pH смеси до 7.0 с помощью HEPES. Концентрация ДНКЖ по данным электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) была ~4.0 мМ. Молярное соотношение Fe : тиол в AcCys-ДНКЖ составляло 1 : 25, в GS-ДНКЖ — 1 : 10.

ДНКЖ с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) получали, смешивая 5 мМ раствор ДНКЖ- PO_4^- в 100 мМ K-фосфатном буфере (КФБ), pH 7.2, с 6.5 мМ раствором липоевой кислоты в изопропанол. Соотношение КФБ и изопропанола составляло 30 : 70 (%). Конечная концентрация LA-ДНКЖ — 1.5 мМ. Молярное соотношение Fe : тиол в LA-ДНКЖ = 1 : 3.

Альбуминовые ДНКЖ получали добавлением ДНКЖ- PO_4^- , содержащих в качестве лигандов фосфатный анион, к 0.15 мМ раствору БСА в 50 мМ КФБ (pH 7.2) в молярном соотношении 1 : 1.5.

Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидроксис-ТЕМРО. Препараты ДНКЖ хранили при -70°C.

Оптическая спектроскопия препаратов ДНКЖ. Спектры поглощения синтезированных препаратов ДНКЖ регистрировали на спектрофотометре Cary 300 (“VarianBio”, США) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Перед

регистрацией ДНКЖ разбавляли 20 мМ КФБ (pH 7.2) до концентрации 20 мкМ.

Окисление дигидрородамина пероксинитритом. При распаде SIN-1 образуется пероксинитрит [27], который окисляет дигидрородамин в родамин. Накопление последнего регистрировали по оптическому поглощению при 500 нм. Перед экспериментом готовили 20 мМ растворы SIN-1 и DHR123 в ДМСО. Реакционная среда содержала 2.7 мМ DHR123 и 2.7 мМ SIN-1 в 20 мМ КФБ (pH 7.4). ДНКЖ вносили в реакционную смесь через 5 мин после начала реакции. Кинетику окисления DHR123 записывали в 1 мм кювете в течение 10 мин при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 300 ("VarianBio", США). Скорость окисления DHR123 оценивали по углу наклона линейного участка кинетической кривой.

Определение восстановленных тиоловых групп. Количественную оценку сульфгидрильных групп проводили с помощью тиол-специфичной флуоресцентной метки ThioGlo1. При добавлении к раствору белка ThioGlo1 образуется тиоловый аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 500 нм при длине волны возбуждения 379 нм [28].

При измерении содержания SH-групп в образцах низкомолекулярных тиолов и ДНКЖ, образованных с их участием, реакционная смесь содержала 0.08 мМ ДНКЖ (по Fe^{2+}) или эквивалентное количество тиола в 100 мМ КФБ (pH 7.4) и 0.8 мМ ONOO^- (1 : 10) или 2 мМ *t*-BOOH (1 : 25)/0.2 мМ (1 : 2.5).

Для анализа SH-групп образцы готовили следующим образом: к 5 мкл реакционной смеси добавляли 5 мкл 0.5 мМ раствора ThioGlo1 в ДМСО и инкубировали 3 мин. Затем полученный раствор (10 мкл) вносили в спектрофлуориметрическую кювету, содержащую 490 мкл 20 мМ КФБ (pH 7.4). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре RF-5301 PC ("Shimadzu", Япония) со средней скоростью сканирования и высокой чувствительностью (в соответствии с обозначениями на приборе). Флуоресценцию регистрировали при 379 нм. Ширина щели возбуждающего и испускаемого света составляла 3 нм.

Окислительная модификация альбумина. Окислительную модификацию БСА осуществляли добавлением к 0.15 мМ раствору белка пероксинитрита (ONOO^-) в молярном соотношении 1 : 10 или *t*-BOOH в молярном соотношении 1 : 25. По истечении 10 мин для ONOO^- и 20 мин для *t*-BOOH образцы БСА анализировали на количество SH-групп и высокомолекулярных агрегатов с помощью ДДС-электрофореза в ПААГ.

ДДС-электрофорез в ПААГ. Электрофорез проводили в блоках 7%-ного ПААГ размером $150 \times 150 \times 1$ мм по методу [29]. К растворам белка добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1,

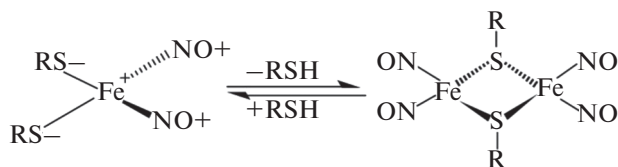


Рис. 1. Равновесие между моноядерными и биядерными ДНКЖ с тиоловыми лигандами: R – тиоловые лиганды: например, Cys – цистеин, @GSH – восстановленный глутатион, LA – липовая кислота.

прогревали в течение 5 мин при 95°C и наносили на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0.1 М Трис-HCl буфера (pH 6.8) с 4% ДДС, 0.2% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили по 5 мкл раствора БСА. В качестве электродного буфера использовали 0.2 М Трис-глициновый буфер (pH 8.3), содержащий 0.1%-ный ДДС. Электрофорез проводили при 4°C и $I = 50$ мА, $U = 150$ В в течение 210 мин. Параметры электрофореза обеспечивались источником питания "Эльф-4" ("ДНК-Технологии", Россия). Данные электрофореза представлены в виде столбчатых диаграмм высокомолекулярных форм белка, полученных при обработке электрофоретического изображения с использованием программы Image Lab Software ("Bio-Rad", США).

Статистический анализ. Для каждого образца ДНКЖ и его тиольного лиганда измерения проводили не менее чем в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили на основе расчета средних арифметических значений и их ошибок. Различия показателей определяли с использованием критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Различия носят статистически достоверный характер, если $p < 0.05$. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами. С помощью метода оптической спектрофотометрии были исследованы низкомолекулярные ДНКЖ, содержащие в качестве тиоловых лигандов N-ацетилцистеин, восстановленный глутатион (GSH) и липовую кислоту. В водных растворах при нейтральном pH тиоловые ДНКЖ существуют в виде парамагнитных моноядерных (М-ДНКЖ) и диамагнитных биядерных комплексов (Б-ДНКЖ) (рис. 1), причем содержание последних составляло до 50% от общего пула ДНКЖ [2, 30].

Спектры оптического поглощения RS-ДНКЖ представлены на рис. 2. Анализ спектров позволил предположить, что используемые в работе

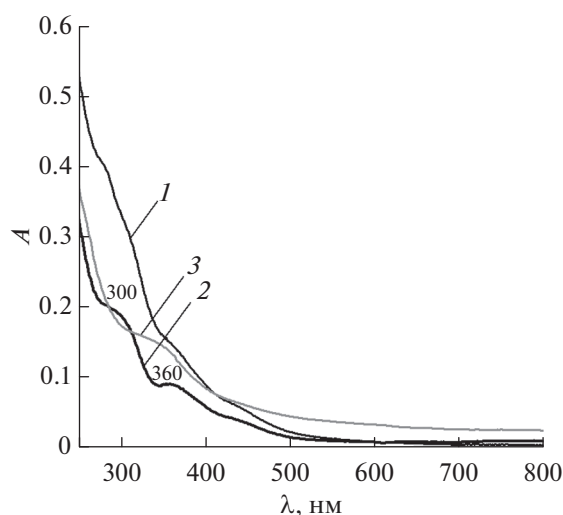


Рис. 2. Спектры оптического поглощения низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами: 1 – AcCys-ДНКЖ, 2 – GS-ДНКЖ, 3 – LA-ДНКЖ.

растворы ДНКЖ действительно содержали существенную долю биядерной формы. На это указывало наличие на спектрах поглощения максимумов в области 310 и 360 нм, которые характерны для Б-ДНКЖ с глутатионом и цистеином [30]. Также было определено количество свободных тиолов в растворах ДНКЖ по флуоресценции с ThioGlo1. AcCys-ДНКЖ содержали 7.3% тиолов, GS-ДНКЖ – 11.1% и LA-ДНКЖ – 1.3%.

В живых системах существует равновесие между М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ [2]. На это равновесие влияют редокс-условия, в первую очередь состояние глутатионовой системы. По мере окисления SH-групп М-ДНКЖ постепенно димеризуются с образованием Б-ДНКЖ, более устойчивых к окислению [2]. Если концентрация тиолов увеличивается, Б-ДНКЖ снова переходят в М-ДНКЖ. Интересно, что в тканях животных образующиеся RS-ДНКЖ в основном представлены в биядерной форме, в то время как в культуре клеток животных – в моноядерной. Причины этого до сих пор не ясны. Можно предположить, что в активно пролиферирующих клетках в культуре более высокая концентрация GSH и более высокий pH [31], что способствует смещению равновесия в сторону М-ДНКЖ.

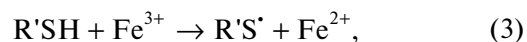
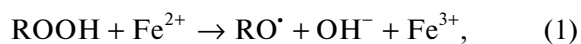
Окисление тиоловых групп, входящих в состав ДНКЖ и их лигандов. Чтобы понять, насколько тиоловые лиганды в составе ДНКЖ устойчивы к окислению, к растворам комплексов добавляли ONOO⁻ или *t*-BOOH в различных молярных соотношениях. Затем в течение 40 мин регистрировали кинетику окисления SH-групп с помощью флуоресценции тиолового аддукта с ThioGlo1. Пероксинитрит и *t*-BOOH были выбраны в качестве окислительных агентов, поскольку позволяли

моделировать нитрозативный и окислительный стресс. В условиях нитрозативного стресса, например при “дыхательном взрыве нейтрофилов”, ONOO⁻ образуется в реакции NO с супероксидным анион-радикалом [14, 15], тогда как *t*-BOOH является аналогом органических гидропероксидов, образующихся при перекисном окислении липидов.

В AcCys и GSH тиоловые группы практически полностью окислялись уже в первые 5 мин (рис. 3а и 3б, кривая 1). В случае, когда AcCys и GSH были включены в комплексы, количество детектируемых SH-групп к концу измерения достигало примерно половины от исходного уровня (рис. 3а и 3б, кривая 2). Несколько иная ситуация наблюдалась при окислении ДНКЖ, содержащих липоевую кислоту. Окисление тиолов в LA-ДНКЖ было на уровне 10%, в то время как в липоевой кислоте уровень окисления тиолов к концу измерения достигал 40% (рис. 3в).

Тиолсодержащие ДНКЖ и их лиганды по отношению к *t*-BOOH оказались менее реакционноспособны. Этот факт согласовывался с результатами работы [32], в которой показано, что реакция пероксида водорода с тиолсодержащими ДНКЖ протекала в 600 раз медленнее реакции с пероксинитритом. В экспериментах при молярном соотношении ДНКЖ : *t*-BOOH, равном 1 : 25, тиоловые лиганды в AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ окислялись практически так же, как и свободные в AcCys и GSH (рис. 4а, 4б). Причем в кинетике окисления GS-ДНКЖ и GSH значимых различий не было (рис. 4б). Однако при инкубации их с более низкой концентрацией органического гидропероксида (соотношение GS-ДНКЖ : *t*-BOOH = 1 : 2.5) удалось зарегистрировать защитное действие ДНКЖ в отношении тиоловых групп (рис. 4г). Добавление в реакционную смесь к GSH ионов Fe²⁺ в концентрации, эквивалентной их содержанию в ДНКЖ, усиливало окисление тиолов (рис. 4г, кривая 3). Этот факт служил еще одним доказательством того, что ионы Fe²⁺ в комплексе с NO не проявляют прооксидантное действие. Вместе с тем, окисление тиоловых лигандов в LA-ДНКЖ не происходило, в то время как свободная LA окислялась практически полностью (рис. 4в).

В реакционной среде, содержащей ионы Fe²⁺, органические гидроперексиды и тиолы, происходят следующие реакции [33–35]:



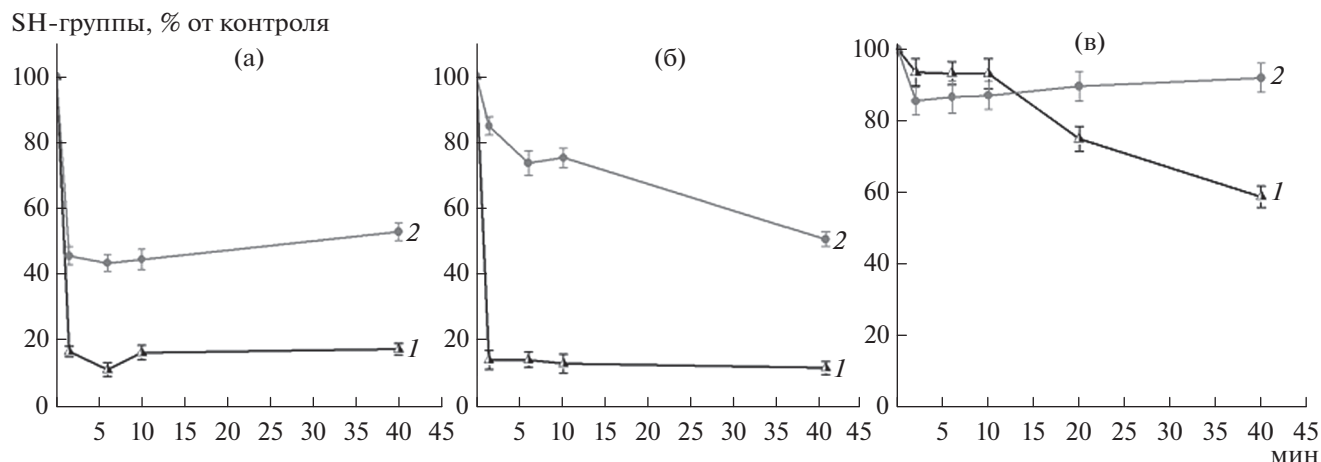


Рис. 3. Окисление SH-групп в AcCys (а, 1), GS (б, 1) и LA (в, 1) и в их ДНКЖ (2) пероксинитритом, добавленным в молярном соотношении к лигандам — 1.25 : 1, к ДНКЖ — 2.5 : 1: Различия между кривыми 1 и 2 для графиков (а) и (б) значимы со 2 мин, для графика (в) с 20 мин (t – тест, $p < 0.05$).

Основную роль в процессах перекисного окисления липидов и других биомолекул играют реакции 1 и 2, в которых образуются алкоксильные ($RO^\bullet$) и алкилперекисные радикалы ($ROO^\bullet$). Реакции 1 и 2 будут происходить и в присутствии примесных ионов железа, то есть без дополнительного введения последних в среду. В реакции 5 тиолы выступают в качестве антиоксидантов, восстанавливая эти радикалы. Тиольные радикалы ($R'S^\bullet$), которые являются продуктами реакций 3 и 4, далее рекомбинируют с образованием дисульфидов (реакция 5). По всей видимости, уровень окисления тиоловых групп будет зависеть от соотношения компонентов реакционной среды и реакционной активности самих тиолов. Так, при высоком содержании t -BOOH увеличение концентрации тиолов в ряду LA, GSH, N-ацетилцистеин приводит к усилению окисления SH-групп. Действительно, тиолы могут стимулировать перекисное окисление липидов, восстанавливая ионы Fe^{3+} до Fe^{2+} [33]. Вместе с тем, связывание ионов железа в ДНКЖ является одним из основных механизмов их антиоксидантного действия. При инкубации с высокой концентрацией органического гидропероксида AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ могут распадаться с высвобождением тиолов и ионов железа, в то же время LA-ДНКЖ более стабильна и лучше защищает входящие в ее состав тиоловые группы (рис. 4в, кривая 2). Этот эффект может быть связан с большей гидрофобностью LA, по сравнению с другими тиоловыми лигандами.

Влияние ДНКЖ на окисление дигидрорамина пероксинитритом. Способность ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления DHR123 пероксинитритом, образующимся при распаде SIN-1 [27]. Поскольку при спонтан-

ном распаде SIN-1 в присутствии кислорода одновременно образуется O_2^- и NO, SIN-1 часто используют для моделирования образования $ONOO^-$ в живых системах [36]. Отметим, что скорость этой реакции очень высока.

На рис. 5 представлена кинетика окисления пероксинитритом DHR123 до родамина. Как видно из рисунка, ДНКЖ дозозависимо снижали скорость окисления DHR123. Причем LA-ДНКЖ оказались наиболее 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 тиольный радикал может быстро реагировать с NO-лигандом ДНКЖ, в результате чего должен формироваться S -нитрозо-тиол.

Влияние ДНКЖ на окисление остатка цистеина БСА. Помимо низкомолекулярных тиолов, основными мишенями действия таких окислителей, как пероксинитрит и гидропероксиды, также являются тиолы в белках [36]. ДНКЖ формируются на белках, как правило, при участии тиоловых групп остатков цистеина [2], поэтому было проведено исследование влияния ДНКЖ на окисление остатков цистеина в БСА. Нативный БСА содержит один восстановленный остаток цистеина (Cys34). С целью количественного анализа модификации SH-групп БСА также был использован ThioGlo1 [37].

В эксперименте использовали ДНКЖ, связанные с цистеином БСА. Для их получения к раствору белка добавляли ДНКЖ с фосфатными лигандами,

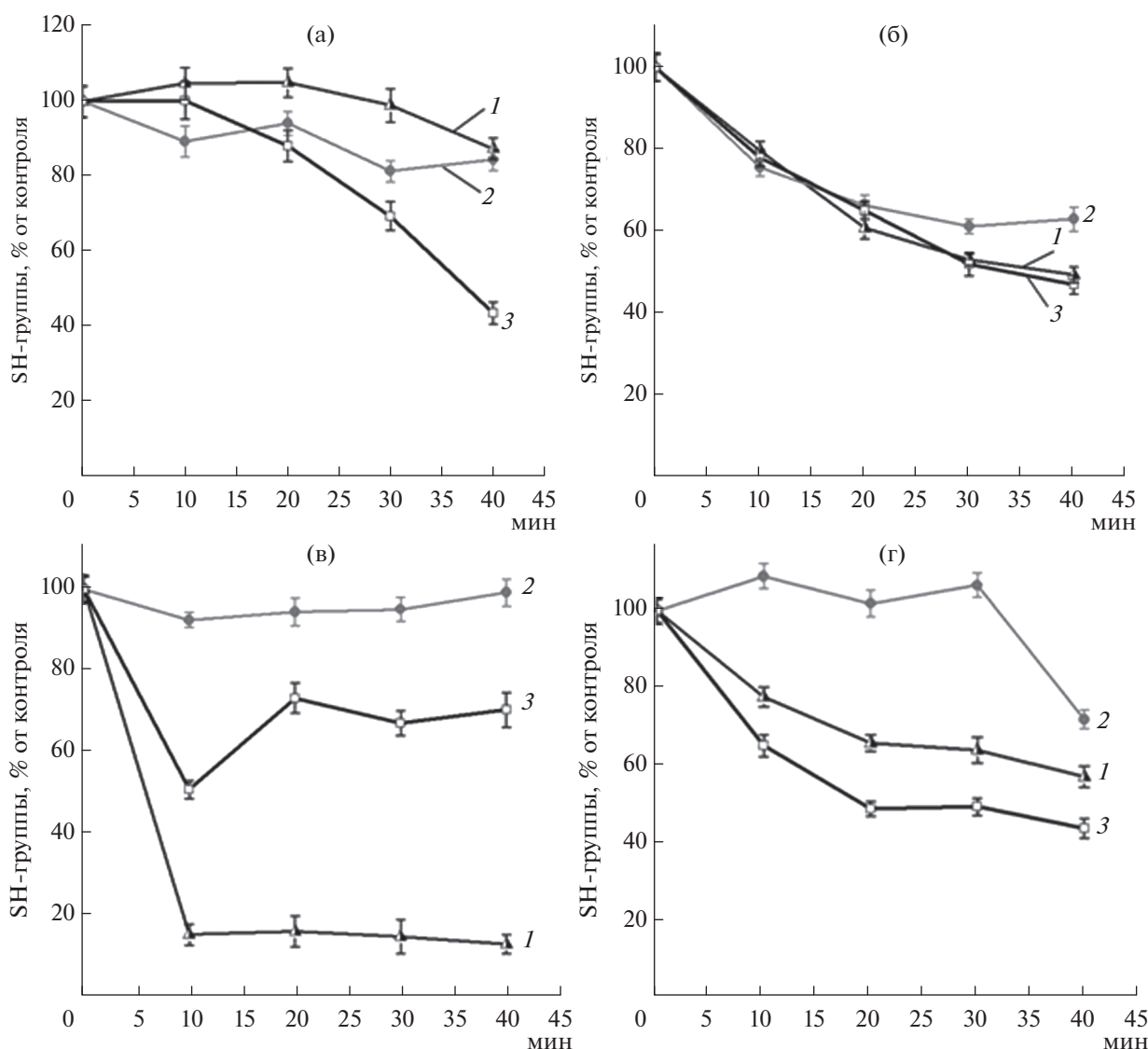


Рис. 4. Окисление SH-групп в AcCys (а), GS (б) и LA (в) и в их ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила (молярное соотношение к лигандам – 12.5 : 1, к ДНКЖ – 25 : 1); (г) – окисление SH-групп в GS и в GS-ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила (молярное соотношение к глутатиону – 1.25 : 1, к ДНКЖ – 2.5 : 1). Концентрация Fe^{2+} в (а), (б) и (в) – 0.16 мМ и в (г) – 0.08 мМ: 1 – лиганд, 2 – лиганд-ДНКЖ, 3 – лиганд + Fe^{2+} .

которые быстро распадаются с переносом железонитрозильного фрагмента ($\text{Fe}^{2+}-(\text{NO})_2$) на белковый тиол. Интенсивность флуоресценции тиолового аддукта БСА-ДНКЖ была примерно на 20% ниже, чем у интактного белка (рис. 6а). Это можно объяснить тем, что включение тиолов в состав комплексов снижает их реакционную способность. Обработка БСА пероксинитритом в молярном соотношении 1 : 10 приводила к окислению 52% цистеинов (рис. 6а, столбик БСА + ONOO^-), по сравнению с интактным неокисленным белком, при этом в образце БСА-ДНКЖ окислялось 44% цистеинов, что на 8% меньше. Аналогичные результаты были получены и при окислении БСА гидропероксидом *трет*-бутила (рис. 6б). Как и в слу-

чае ONOO^- , протекторный эффект ДНКЖ был незначителен и составлял те же 8% при сравнении доли окисленных тиолов в БСА и БСА-ДНКЖ.

Как известно, окисление остатков цистеина сопровождается образованием сульфидных и сульфоновых кислот, а также дисульфидных связей. В последнем случае, благодаря межбелковым S–S-сшивкам образуются димеры и более высокомолекулярные агрегаты белка. Образование сшитых с помощью дисульфидных связей форм белка регистрировали методом денатурирующего ДДС-электрофореза в 7%-ном ПААГ. Добавление к образцам белка для электрофореза ДТТ, восстанавливающего дисульфидные связи, показало, что агрегация белка вызвана именно

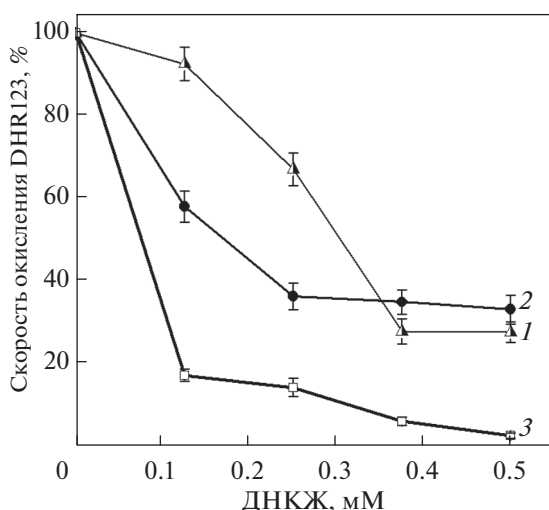


Рис. 5. Влияние низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на скорость окисления дигидрорадамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции SIN-1: 1 — AcCys-ДНКЖ, 2 — GS-ДНКЖ, 3 — LA-ДНКЖ. Скорость окисления дигидрорадамина в контрольном варианте (без добавок ДНКЖ) принимали за 100%.

S—S-сшивками. В присутствии ДТТ количество высокомолекулярных форм, в основном представленных димерами, было примерно одинаково в опытах с воздействием ONOO^- — ~14% и с $t\text{-BOOH}$ — ~7% (рис. 7, серые столбцы). В то же время без ДТТ под действием ONOO^- количество таких форм в БСА без ДНКЖ составило 25% (рис. 7а, заштрихованные столбцы), а под действием $t\text{-BOOH}$ — 12% (рис. 7б, заштрихованные столбцы). Включение тиолов БСА в ДНКЖ сни-

жало с 24 до 19% долю сшивок под действием ONOO^- и с 12 до 9% под действием $t\text{-BOOH}$ (рис. 7а и 7б соответственно, заштрихованные столбцы). Однако практически такое же количество сшивок наблюдалось и в случае неокисленного БСА-ДНКЖ. Это означает, что в процессе подготовки белка для электрофореза комплексы распались, высвобождая ионы железа, которые индуцировали реакции окисления, в первую очередь SH-групп.

Полученные результаты, с одной стороны, демонстрировали незначительное протекторное действие ДНКЖ на белковые тиолы, а, с другой, не показали усиления процессов окислительной модификации, которые могли бы происходить в присутствии прооксидантов, образуемых с участием содержащегося в комплексах двухвалентного железа. Это служило дополнительным подтверждением слабого прооксидантного действия ДНКЖ по отношению к альбумину и согласовывалось с результатами более ранних экспериментов, в которых было показано, что ДНКЖ по отношению к гемоглобину (Hb) действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие входящий в их состав цистеин (Cys93 β) от окисления [26].

Эти результаты согласовывались с результатами работы [20], в которой было показано, что ДНКЖ, связанные с альбумином, могут защищать остатки цистеина и гистидина от модификации NOCl . В то же время установлено, что глутатионовые лиганды в ДНКЖ реагируют с NOCl гораздо менее эффективно, чем свободный GSH. Нельзя исключить и то, что в процессе окисления связанных с белками ДНКЖ они могут из моноядерной формы трансформироваться в более стабильную биядерную [2].

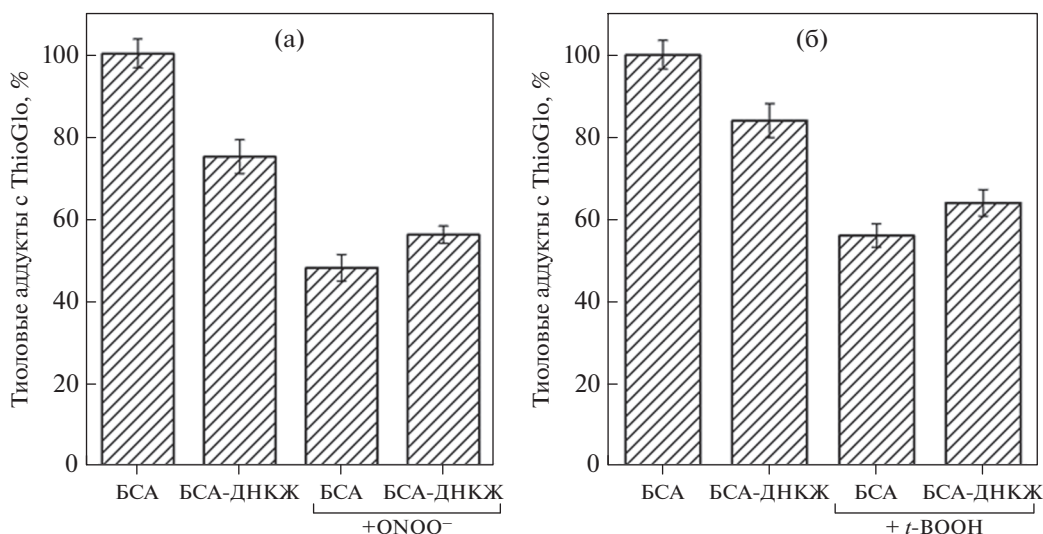


Рис. 6. Влияние образования БСА-ДНКЖ на окисление Cys34 БСА пероксинитритом (а, БСА : ONOO^- = 1 : 10) и $t\text{-BOOH}$ (б, БСА : $t\text{-BOOH}$ = 1 : 25).

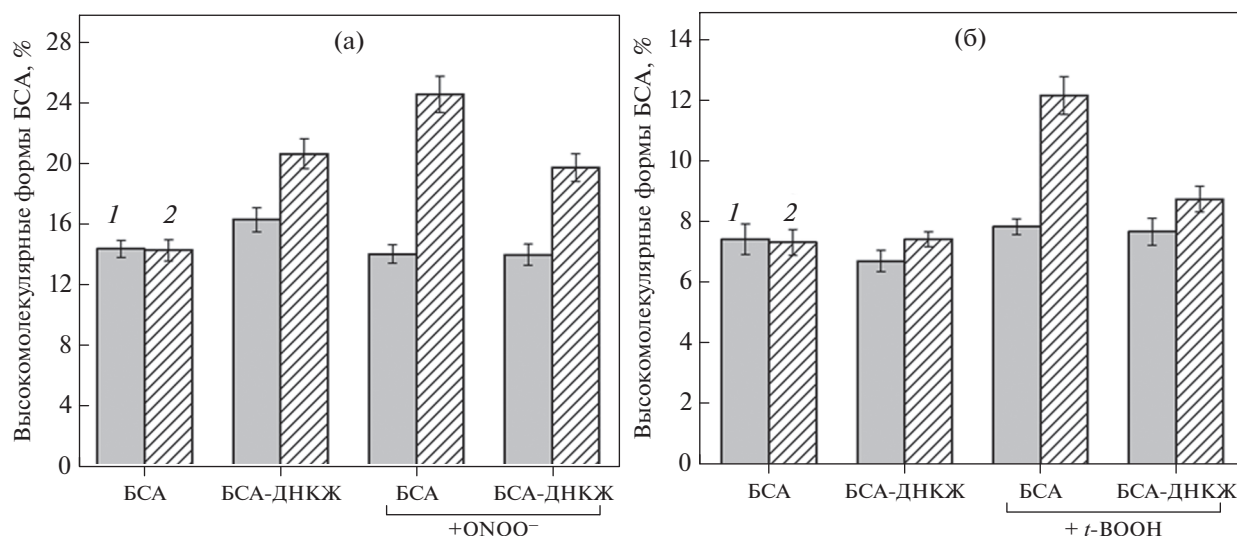
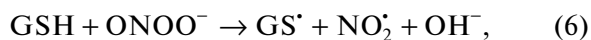


Рис. 7. Влияние связанных с БСА ДНКЖ на образование высокомолекулярных форм БСА (%) под действием пероксинитрита (а) и *t*-BOOH (б) по данным электрофореза в 7%-ном ПААГ с ДДС-Na: 1 – опыты с ДТТ, 2 – без ДТТ.

Кроме этого, ранее было исследовано влияние ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина. ДНКЖ, связанные с Hb или глутатионом, эффективно защищали этот белок от окислительной модификации, вызванной ONOO⁻ [14, 15] и *t*-BOOH [26]. Они препятствовали образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, предотвращали деградацию гемовой группы и образование межбелковых сшивок.

Взаимодействие тиолсодержащих ДНКЖ с пероксинитритом было исследовано в работах [26, 32]. Пероксинитрит окислял GS-ДНКЖ по двухэлектронному механизму ($k = 1.8 \pm 0.3 \times 10^7 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$). В ходе этой реакции образуется интермедиат, содержащий связанный с железом пероксинитрит – (GS)₂-Fe-(ONOO)(NO) [26, 32, 38], который распадается с высвобождением нерадикальных продуктов или участвует в нитровании биомолекул [38].

Тиоловые лиганды, входящие в состав упомянутых выше интермедиатов, скорее всего, окисляются без образования тиольных радикалов [11]. Это выгодно отличает ДНКЖ от их лигандов, которые в реакции с ONOO⁻ образуют свободнорадикальные продукты (реакции 6–8) [25]:



Помимо протекторного действия на SH-группы, ДНКЖ могут выступать в роли регуляторов реакционной способности белковых тиолов [39]. Так, включение Cys93β гемоглобина в состав

ДНКЖ, с одной стороны, защищает их от окисления органической гидроперекисью, а, с другой, в случае распада комплексов при высоких концентрациях окислителей, тиол может высвобождаться в виде тиолят-аниона (R-S⁻), реакционная активность которого значительно выше, чем у протонированной формы тиола (Cys-SH). Тиолят-анион проявляет высокую реакционную способность по отношению к электрофильным соединениям, что приводит к формированию стабильной модификации белка. Таким образом, включение SH-групп в ДНКЖ позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов при слабом окислительном стрессе и, наоборот, ускорить их при высоком уровне стресса.

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

ствие Fe^{2+} . Можно заключить, что наличие слабосвязанного железа в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами не является препятствием для использования этих комплексов в биомедицине.

В состав ДНКЖ могут входить не только тиоловые группы цистеина и глутатиона, но и другие анионные и неанионные лиганды различных биополимеров (белков, полисахаридов и т.д.). Ранее было установлено [12, 26], что ДНКЖ, ассоциированные с белками (альбумином и гемоглобином), разрушались активными формами кислорода в меньшей степени, чем низкомолекулярные комплексы. Связанные с биологически совместимыми полимерами ДНКЖ могут послужить основой для создания наночастиц фармакологического назначения [40]. Включение ДНКЖ в состав наночастиц значительно повышает их стабильность и увеличивает выход NO в физиологических условиях. Такие наночастицы обеспечивают адресную доставку ДНКЖ в клетки и поэтому могут применяться для лечения социально значимых заболеваний, в том числе рака [40]. Стабильность ДНКЖ по отношению к действию окислителей — необходимый критерий для их использования в биомедицине.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 19-29-12052).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsiao H.-Y., Chung C.-W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.-T. // Dalton Transactions. 2019. V. 48. № 26. P. 9431–9453.
2. Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2016. V. 54. P. 15–29.
3. Vanin A.F., Mokh V.P., Serezhnikov V.A., Chazov E.I. // Nitric Oxide. 2007. V. 16. № 3. P. 322–330.
4. Kapelko V.I., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Lukoshkova E.V., Undrovina N.A., Khapchaev A.Y., Shirinsky V.P. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. V. 2017. e9456163. <https://doi.org/10.1155/2017/9456163>
5. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Burgova E.N., Vanin A.F. // Eur. J. Pharmacol. 2011. V. 662. № 1–3. P. 40–46.
6. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. V. 284. P. 1577–1584.
7. Shamova E.V., Bichan O.D., Drozd E.S., Gorudko I.V., Chizhik S.A., Shumaev K.B. et al. // Biophysics. 2011. V. 56. № 2. P. 237–242.
8. Igrunkova A., Fayzullin A., Serezhnikova N., Lipina T., Pekshev A., Vanin A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 5. e4439. <https://doi.org/10.3390/ijms24054439>
9. Чазов Е.И., Родненков О.В., Зорин А.В., Лакомкин В.Л., Грамович В.В., Выборов О.Н. и др. // Кардиология. 2011. Т. 51. № 11. С. 28–37.
10. Родненков О.В., Зорин А.В., Гостеев А.Ю., Драгнев А.Г., Чазов Е.И. // Евразийский Кардиологический Журнал. 2016. № 3. С. 186–187.
11. Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. № 5. P. 569–574.
12. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K. et al. // Nitric Oxide. 2008. V. 18. № 1. P. 37–46.
13. 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.
14. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Chumikina L.V., Arabova L.I., Yaglova N.V. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 4. P. 411–420.
15. 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>
16. Martusevich A.K., Soloveva A.G., Dmitrochenkov A.V., Ezhevskaya A.A., Razumovsky A.V. // Annual Research & Review in Biology. 2018. V. 26. № 6. P. 1–11.
17. Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Davyduk A.V. // Biophysics. 2014. V. 59. № 6. P. 954–959.
18. Dungal P., Perlinge M., Weidinger A., Redl H., Kozlov A.V. // Free Radic. Biol. Med. 2015. V. 89. P. 300–310.
19. Shumaev K.B., Dudylyna A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. // BioFactors. 2018. V. 44. № 3. P. 237–244.
20. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenkov O.M., Vanin A.F., Topunov A.F. et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. V. 2019. e2798154. <https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
21. Vanin A.F., Pekshev A.V., Vagapov A.B., Sharapov N.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A. et al. // Biophysics (Oxf). 2021. V. 66. № 1. P. 155–163.
22. Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. // Cell Biochem. Biophys. 2021. V. 79. № 1. P. 93–102.
23. Vanin A.F. // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. № 11. P. 1367–1386.
24. Bosworth C.A., Toledo J.C. Jr., Zmijewski J.W., Lancaster J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 12. P. 4671–4676.
25. Karoui H., Hogg N., Kalyanaraman B. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 330. № 1. P. 115–124.
26. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // Methods Enzymol. 2008. V. 436. P. 445–461.
27. Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Konorev E., Kalyanaraman B. // Arch. Biochem. Biophys. 1999. V. 361. № 2. P. 331–339.
28. Hoff S., Larsen F.H., Andersen M.L., Lund M.N. // Analyst. 2013. V. 138. № 7. P. 2096–2103.
29. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
30. Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.K., Burbaev D.S. // Nitric Oxide. 2011. V. 23. № 2. P. 136–149.
31. Flinck M., Kramer S.H., Pedersen S.F. // Acta Physiol. (Oxf). 2018. V. 223. № 3. e13068. <https://doi.org/10.1111/apha.13068>

32. Лобышева И.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф. // Биохимия. 1999. V. 64. № 2. P. 194–200.
33. Tien M., Bucher J.R., Aust S.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. № 1. P. 279–285.
34. Younes M., Strubelt O. // J. Appl. Toxicol. 1990. V. 10. № 5. P. 319–324.
35. Olson A.S., Jameson A.J., Kyasa S.K., Evans B.W., Dussault P.H. // ACS Omega. 2018. V. 3. № 10. P. 14054–14063.
36. Daiber A., Daub S., Bachschmid M., Schildknecht S., Oelze M., Steven S. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 4. P. 7542–7570.
37. Fabisiak J.P., Sedlov A., Kagan V.E. // Antioxid. Redox Signal. 2002. V. 4. № 5. P. 855–865.
38. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënné-Loccoz P., Callan P.E. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. № 5. P. 1184–1187.
39. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 512–520.
40. Akentieva N., Gizatullin A., Sanina N., Shkondina N., Abramova K., Tikhonov V. et al. // Biointerface Res. Appl. Chem. 2023. V. 13. № 4. e344.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC134.344>

Effect of Peroxynitrite and *tert*-Butyl Hydroperoxide on Thiol Ligands of Dinitrosyl Iron Complexes

I. S. Pugachenko^a, 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 the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Low molecular weight dinitrosyl iron complexes (DNICs) with thiol-containing ligands are a physiological form for deposit and transport of nitric oxide (NO) in the organism, herewith DNICs can exhibit antioxidant and antiradical properties. It was that DNICs containing cysteine, glutathione and lipoic acid as ligands, decreased the rate of dihydrodamine oxidation by peroxynitrite formed during 3-morpholinononymine decomposition. Thiol (sulfhydryl) ligands are present in DNICs in the form of thiolate anions (R-S⁻), which protects these groups from oxidation by peroxynitrite. When *tert*-butyl peroxide was used as an oxidizer at low concentration, the protective effect of DNICs on their SH-groups was observed for complexes with lipoic acid (LA-DNIC) and with glutathione (GS-DNIC). LA-DNIC was more resistant to oxidizing agents and more effective peroxynitrite trap than other DNICs. DNICs associated with bovine serum albumin had a negligible protective effect on cysteine residue during oxidation by peroxynitrite and *tert*-butyl hydroperoxide. The obtained results allow us to consider low molecular weight DNICs with thiol ligands as peroxynitrite traps and thiol residues protectors in proteins.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, thiols, *tert*-butyl hydroperoxide, peroxynitrite