

УДК 577.122:542.963.4

ГЛИКИРОВАНИЕ МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ ЛЕГОГЛОБИНА В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ ГЕМОГЛОБИНАМИ И ВЛИЯНИЕ НА ИХ ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2025 г. Э. И. Насыбуллина¹, О. В. Космачевская¹, 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 16.04.2025 г.

После доработки 29.04.2025 г.

Принята к публикации 29.04.2025 г.

Проведено изучение подверженности неферментативному гликированию гемоглобиновых белков разного происхождения. Были исследованы леогоглобин (**Lb**) из клубеньков бобов, миоглобины (**Mb**) из мышц кашалота и сердца лошади и гемоглобины (**Hb**) из эритроцитов быка и человека. Степень гликирования Lb была в 2.5 раза выше, чем у Mb кашалота и Hb человека, и в 5 раз выше, чем у Mb лошади и Hb быка. В микроаэробных условиях количество конечных продуктов гликирования было в три раза ниже, чем в кислородсодержащей среде, а также медленнее шла и деградация гема. Гликирование влияло на пероксидазную активность гемопротеидов. Исходная скорость пероксидазной реакции Lb была в 6 раз выше, чем у миоглобинов, и в 10–13 раз выше, чем у гемоглобинов. Гликирование снижало скорость пероксидазной реакции Lb и гемоглобинов, у миоглобинов она либо не изменялась, либо возрастала в зависимости от времени инкубации с МГ.

Ключевые слова: леогоглобин, гемоглобин, миоглобин, метилглиоксаль, неферментативное гликирование, пероксидазная активность

DOI: 10.7868/S3034574X25050039

Неферментативное гликирование, проходящее благодаря реакции Майяра, — повсеместно распространенная необратимая посттрансляционная модификация белков, которая приводит к изменению их структуры и свойств. Вследствие этого нарушается функционирование белков, снижается их растворимость, стабильность и способность к протеолитической деградации. Обычно неферментативное гликирование происходит в реакции аминоксигмандимитов с активными карбонильными соединениями — восстанавливающими сахарами и продуктами их метаболизма: глиоксалем, метилглиоксалем (**МГ**), 3-дезоксиглюкозоном, малоновым диальдегидом и др. [1]. Процесс начинается с образования оснований Шиффа, затем следует перегруппировка Амадори и образование стабильных белковых аддуктов — конечных продуктов гликирования (**КПГ**, **AGEs** — Advanced Glycation end products). КПГ представляют собой группу химических соединений различного строения, вклю-

чая производные пиррола, пиразина, имидазола и фурана [2]. Чаще всего в белках модификации подвергаются остатки лизина, аргинина и N-концевые аминокислоты [3, 4], а поскольку гемоглобиновые белки содержат большое количество остатков лизина (в среднем 9%), они часто являются мишенью для гликирующих агентов: глиоксаля и МГ.

Многие связанные с белками КПГ демонстрируют высокую интенсивность автофлуоресценции при возбуждении дальним УФ-светом. Автофлуоресценцией обладают перекрестно-сшитые КПГ, образованные с участием двух остатков лизина [5]. Глубокая УФ-индуцированная автофлуоресценция (deep-UV-induced autofluorescence — deep-UV-IAF) позволяет обнаруживать широкий спектр клинически значимых КПГ, таких, как пентозидин ($\lambda_{исп.} \sim 380$ нм), аргпиримидин ($\lambda_{исп.} \sim 395$ нм), весперлизин С ($\lambda_{исп.} \sim 405$ нм), весперлизин А/В ($\lambda_{исп.} \sim 440$ нм) и КПГ, полученные

из аргинина ($\lambda_{\text{исп.}} \sim 525$ нм) [6]. Накопление КПП является индикатором многих заболеваний [7].

Наиболее активным гликирующим агентом является α -кетальдегид – метилглиоксаль (МГ) [8]. Существует много путей образования этого дикарбонильного соединения, однако чаще всего он образуется как побочный продукт метаболизма глюкозы в гликолитическом пути [9]. Образование МГ в клетках прокариот и эукариот описано в обзорах [10, 11]. Ситуация, когда дикарбонильные соединения накапливаются в результате их повышенной продукции и/или снижения детоксикации, получила название дикарбонильный стресс [1, 12]. Это состояние сопровождается метаболические и возрастные заболевания, при которых усиливаются окислительные и воспалительные реакции [7].

Дикарбонилы участвуют в возникновении и обострении диабета, атеросклероза, ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, почечной недостаточности, неврологических расстройств и рака [4, 12, 13]. Считают, что именно МГ ответственен за дисфункцию микро- и макрососудов при сахарном диабете [8, 12]. Обсуждается использование МГ в качестве нового биомаркера для диагностики сахарного диабета [8], а гидроимидазолоновые КПП, полученные из аргинина, накапливающиеся в стареющих и дисфункциональных тканях, предложено рассматривать как маркеры прогрессирования различных заболеваний [1, 4].

Гемоглобиновые белки обладают высокой склонностью к гликированию, поскольку содержат в своем составе доступные остатки лизина и аргинина. Эритроцитарные гемоглобины из-за долгого времени жизни являются аккумуляторами КПП. Отметим, что гемоглобиновые белки образуют суперсемейство. Характерными представителями этого суперсемейства являются гемоглобин (Hb) миоглобин (Mb) и левоглобин (леггемоглобин, Lb). Левоглобин – это растительный гемоглобин, синтезирующийся в азотфиксирующих клубеньках бобовых растений, где он выполняет функцию кислородного буфера. По строению и свойствам Lb подобен миоглобину. В отличие от Mb и Hb, гликирование Lb практически не исследовано. Была поставлена задача изучить гликирование метилглиоксалем Lb в сравнении с гемоглобинами и миоглобинами. Поскольку гемоглобиновые белки проявляют пероксидазную активность (часто ее называют псевдопероксидазной, чтобы отличить от активности истинных пероксидаз), было также изучено влияние гликирования на их способность восстанавливать перекись водорода.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: гемоглобины из эритроцитов быка и человека, миоглобины из скелетных мышц кашалота и сердца лошади, метилглиоксаль, гидропе-

роксид *трет*-бутила (*t*-BOOH), дигидрохлорид *о*-дианизидина, пиридин, аскорбат натрия, дитионит натрия, метилглиоксаль, полиакриламид (ПААГ), додецилсульфат натрия (SDS), кумасси бриллиантовый синий R-250 – “Sigma-Aldrich” (США), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) – “AppliChem” (Германия), Трис – “ICN” (США). Toyopearl HW-50 Fine, Toyopearl 650 M DEAE – производства “Тоуо Soda”, Япония. Остальные реактивы – “Реахим” (Россия), квалификации “хч” или “осч”.

Выделение и очистка левоглобина из клубеньков бобов. Lb выделяли из корневых клубеньков бобов (*Vicia faba* L.) сорта “Русские черные” (иногда употребляется название *Faba bona* Medik) по методу [14]. Растения выращивали в полевых условиях Московской области (Россия), клубеньки собирали на стадии бутонизации – начала цветения, отделяли от растений и заливали холодным 100 мМ К-фосфатным буфером (pH 7.2), содержащим 200 мМ аскорбата натрия, 1% высокомолекулярного поливинилпирролидона, 50 мкМ ФМСФ и 1 мМ MgCl_2 . Соотношение буфера и клубеньков составляло 3 : 1 по массе. Клубеньки тщательно растирали в агатовой ступке, после чего гомогенат фильтровали через 2 слоя капронового полотна. Фильтрат центрифугировали с охлаждением в течение 5 мин при 1000 g для удаления из экстракта загрязнений и крупных частиц растительной ткани. Lb-содержащую фракцию получали высадкой белков супернатанта $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в диапазоне насыщения 40–80%. Осадок, содержащий Lb, растворяли в минимальном количестве 20 мМ К-фосфатного буфера (pH 7.2), центрифугировали при 23000 g в течение 20 мин, после чего супернатант наносили на колонку (2 × 43 см) с носителем Toyopearl HW-50 Fine, уравновешенным 25 мМ Трис-НСl (pH 7.5) с 200 мМ NaCl. Для подавления активности протеаз в буфер добавляли ФМСФ до конечной концентрации 10 мкМ.

Последующую очистку Lb проводили на анионообменнике Toyopearl 650 M DEAE на колонке 2 × 4 см, уравновешенной 25 мМ Трис-НСl буфером (pH 7.5). Фракционирование Lb проводили линейным градиентом NaCl от 0 до 0.5 М. Скорость элюции составляла 2.13 мл/мин. Фракция Lb выходила с колонки при концентрации NaCl 0.2–0.4 М. Элюат, собранный с ионообменной колонки, окисляли феррицианидом калия и диализовали против 25 мМ К-фосфатного буфера, pH 7.2. Белок концентрировали на мембране Millipore (“Merck”, Германия), в ячейке для ультрамембранного концентрирования под током аргона. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Концентрацию Lb определяли, используя коэффициент миллимолярной экстинкции $\epsilon_{525} = 9.52 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$, поскольку длина волны 525 нм в спектрах metLb и oxyLb соответствует изобестической точке.

Получение оксигенированных гемоглобиновых белков. Для получения оксигенированных гемоглобиновых белков к 0.6 мМ раствору белка добавляли кристаллический дитионит натрия, восстанавливающий гемопротеиды. Затем растворы белков диализовали в течение 15 ч при 4°C против 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7.2). Оксигенированную форму регистрировали по характерным максимумам на спектре оптического поглощения.

Неферментативное гликирование гемоглобиновых белков. Для проведения реакции неферментативного гликирования использовали MG. Реакционная среда содержала 0.06 мМ оксигенированных гемопротеидов в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 7.4, 5 мМ MG (белок : MG = 1 : 80 мМ). Инкубацию проводили при 37°C в течение 96 ч.

В случае Lb реакционная среда содержала 0.24 мМ охуLb в 25 мМ К-фосфатном буфере, рН 7.4, 12 мМ MG (Lb : MG = 1 : 50). Инкубацию проводили при 37°C в течение 120 ч. При изучении влияния кислорода для создания микроаэробных условий флаконы с раствором Lb 15 мин продували газообразным азотом квалификации "осч" (объемная доля кислорода не более 0.0005%).

Конечные продукты неферментативного гликирования измеряли по автофлуоресценции при длине волны возбуждения 320 нм и длине волны испускания 450 нм. Измерения проводили на спектрофотометре RF-5302 PC ("Shimadzu", Япония) в 0.5 мл микрокювете при средней скорости сканирования, высокой чувствительности (по маркировке прибора), ширине щели возбуждающего света 5 нм и испускаемого света 10 нм. Перед измерением белковый раствор разбавляли в 10 раз.

SDS-электрофорез в ПААГ. Электрофорез проводили в блоках 12%-ного ПААГ размером 15 × 15 × 2 мм по методу Лэммли. Образцы Lb, приготовленные как описано выше, предварительно диализовали в К-фосфатном буфере для отделения низкомолекулярных веществ, затем добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1, 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 (рН 6.8) с 4% SDS, 0.2% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили по 20 мкл раствора белка. В качестве электродного буфера использовали 0.2 М Трис-глициновый буфер (рН 8.3), содержащий 0.1% SDS. После окончания процесса разделения белков гель фиксировали и окрашивали раствором Кумасси бриллиантового синего R-250. Электрофорез проводили при 4°C и I = 50 мА, U = 150 В. Был использован источник питания Эльф-4 ("Хеликон", Россия).

Определение пероксидазной активности. Пероксидазную активность белков определяли спектрофотометрически, измеряя гидропероксид-зависимое окисление *o*-дианизидина по методу [15]. Состав реакционной смеси: 80 мМ К-фосфатный

буфер (рН 7.2), 1 мМ *o*-дианизидин, 3 мкМ гемопротеида. Реакцию инициировали добавлением *t*-BOON до конечной концентрации 4.7 мМ. Образование продукта окисления *o*-дианизидина — бисазобифенила регистрировали спектрофотометрически при 450 нм при 25°C в течение 10 мин с интервалом в 10 с. Для расчета концентрации продукта использовали коэффициент экстинкции 30 мМ⁻¹см⁻¹. Пероксидазную активность выражали в мкмольх бисазобифенила, образовавшегося за минуту.

Спектрофотометрические измерения. Спектры оптического поглощения регистрировали в диапазоне от 220 до 700 нм на UV-VIS спектрофотометре Cary 300 ("VarianBio", США) при комнатной температуре в кювете (V = 0.5 мл) с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин.

Все эксперименты были выполнены не менее чем в трех повторностях. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. Статистическая обработка данных проводилась исходя из 3–5 аналитических повторностей в режиме Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение леглобина из клубеньков бобов. В настоящей работе стояла задача сравнить подверженность гликированию Lb с другими гемоглобиновыми белками (миоглобинами и гемоглобинами). Для этого был необходим очищенный препарат Lb из клубеньков бобов. Lb выделяли по стандартной методике [14], которая включала очистку с помощью гель-фильтрации на носителе Toyopearl HW-50 Fine и ионообменной хроматографии на носителе Toyopearl 650 M DEAE. Эти носители дали лучшие результаты при очистке Lb. Профиль элюции белков на колонке Toyopearl HW-50 Fine имел три пика (рис. 1а), Lb выходил со вторым. При ионообменной хроматографии Lb выходил первым пиком (рис. 1б).

Полученный таким образом Lb был охарактеризован с помощью спектров оптического поглощения в УФ-видимом диапазоне и спектров пиридингемохромового комплекса. Характер спектров (максимумы поглощения 411, 536 и 566 нм) соответствовал оксигенированной форме Lb (рис. 2а). Спектр восстановленного комплекса Lb с пиридином в щелочном растворе также имел максимумы поглощения (480, 526 и 556 нм), характерные для нативного немодифицированного белка (рис. 2б).

Модификация леглобина метилглиоксалем. Влияние кислородных условий. В отличие от гемоглобинов и миоглобинов, неферментативное гликирование Lb ранее практически не было изучено. Ранее была выделена фракция гликированного Lb из клеток *E. coli*, в которых он был

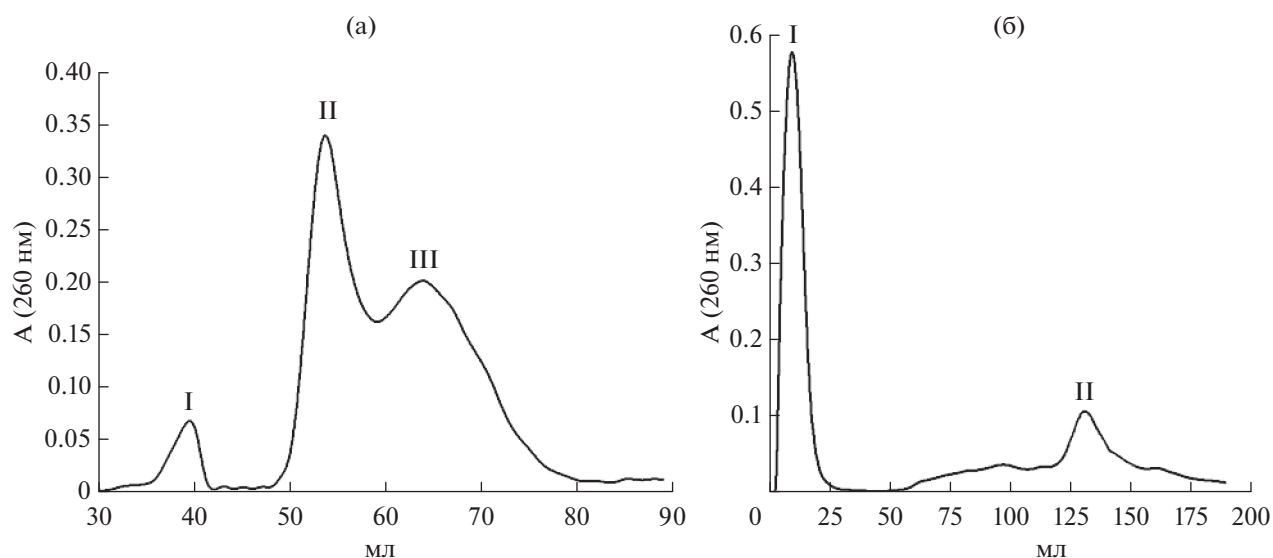


Рис. 1. Профиль элюции белков цитозоля клубеньков бобов на колонке Toyopearl HW-50F: I – белки с ММ > 110 кДа, II – белки с ММ 90–60 кДа, III – белки с ММ 60–15 кДа (а); профиль элюции белков фракции II на колонке Toyopearl 650 M DEAE с помощью градиента концентрации NaCl 0–0.5 М (б).

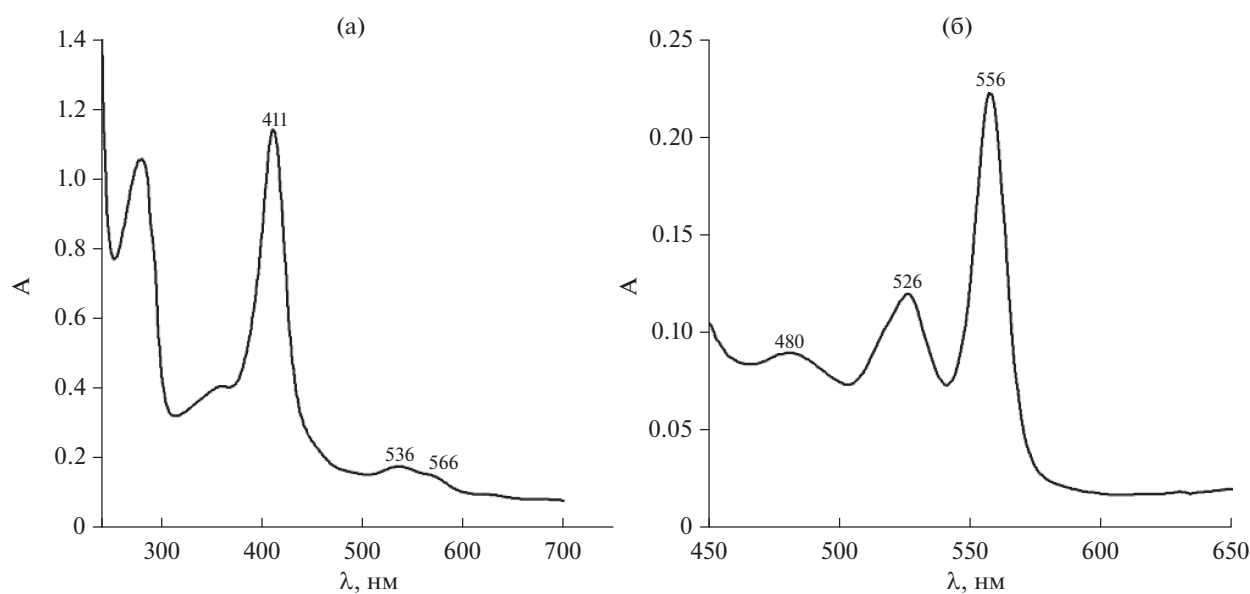


Рис. 2. Спектры оптического поглощения Lb, выделенного из клубеньков бобов, в К-фосфатном буфере, pH 7.2, (а); спектры восстановленного Lb в щелочном растворе пиридина (б).

экспрессирован [16]. В настоящей работе было проведено неферментативное гликирование Lb метилглиоксалем в опытах *in vitro*. Реакция протекала при двух вариантах кислородных условий в течение 120 ч (5 сут). На рис. 3 представлены результаты SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ леоглобина, отобранного в разное время инкубации с MG. При повышении степени гликирования Lb происходило уменьшение доли димерной и тетрамерной форм белка с одновременным увеличением количества высокомолекулярных олигомерных форм. Анало-

гичная картина наблюдалась и в экспериментах с Mb кашалота.

При этом происходила агрегация белка с высвобождением и/или разрушением гемовой группы, о чем также свидетельствуют и спектры оптического поглощения (рис. 4). В ходе инкубации с MG снижалось поглощение в области полосы Soret (418 нм) и увеличивалось поглощение при 280 нм. Причем снижение поглощения в полосе Soret было сильнее выражено в кислородсодержащей среде, что свидетельствует о том, что в этих условиях про-

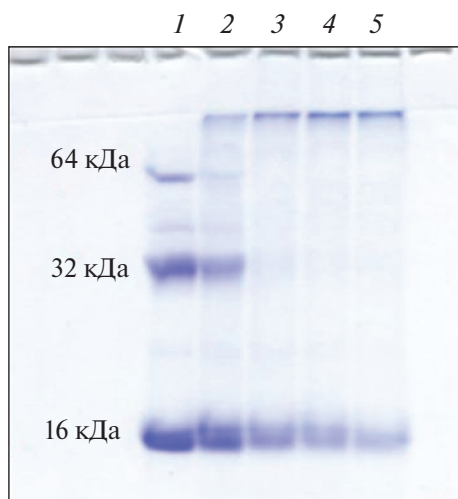


Рис. 3. Электрофорез Lb в 12%-ном ПААГ с SDS после инкубации с метилглиоксалем в соотношении $\text{oxyLb} : \text{MG} = 1 : 80$ mM в течение 0 (1), 6 (2), 24 (3), 48 (4), 72 (5) ч.

исходит образование активных форм кислорода, разрушающих гемовую группу белка. Образование супероксидного анион-радикала ранее было зарегистрировано в реакции гликирования аминокислот и белков [17, 18]. Напротив, поглощение в УФ-области было выше в микроаэробной среде. Особенно хорошо изменения были заметны через 120 ч инкубации. Измерение автофлуоресценции белка также показало, что в присутствии кислорода образуются связанные с белком КПГ (рис. 5). Результаты, полученные для Lb, характерны и для

других подобных белков, поскольку отражают особенности реакции неферментативного гликирования. Эта реакция сильно зависит от условий протекания: от наличия металлов, температуры, pH, кислородного режима [7]. Поскольку процессы гликирования сопряжены с процессами окисления, часто для описания этой посттрансляционной модификации используют термин “гликоокисление”.

Пероксидазная активность гемоглибиновых белков, модифицированных метилглиоксалем. Известно, что неферментативное гликирование приводит к изменению ферментативных активностей гемоглибиновых белков [19–22]. Нами было изучено влияние гликирования метилглиоксалем на пероксидазную активность Lb из клубеньков бобов, Mb из мышц кашалота и лошади, Hb из эритроцитов человека и быка. Гемопротейды инкубировали с MG в кислородсодержащей среде в течение 96 ч (4 сут) при 37°C. Степень модификации определяли по интенсивности автофлуоресценции образованных на белке КПГ (рис. 6). При одинаковых условиях в наибольшей степени гликировался Lb.

В ходе инкубации белков с MG через каждые 24 ч отбирали пробы для определения пероксидазной активности, которую измеряли в присутствии *t*-BOOH и *o*-дианизидина. На рис. 7 представлено изменение пероксидазной активности исследованных гемопротейдов. Гликирование Lb и гемоглибинов приводило к снижению начальной скорости пероксидазной реакции. К 96 ч инкубации активность гликированного Lb (GLb) была примерно в два раза ниже, чем в немодифицированном белке. Аналогичные изменения наблюдались и для GNb человека. В GNb быка активность была ниже

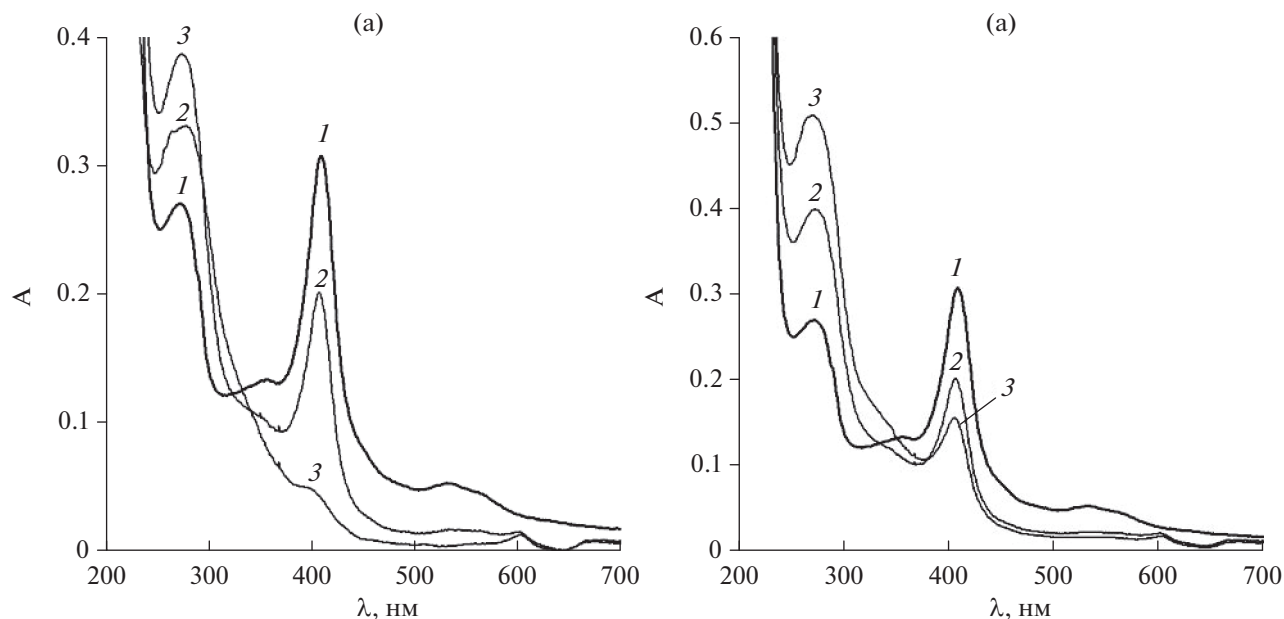


Рис. 4. Спектры оптического поглощения Lb, обработанного метилглиоксалем в кислородсодержащей среде (а) и в микроаэробных условиях (б), в течение 48 (1), 72 (2) и 120 (3) ч реакции.

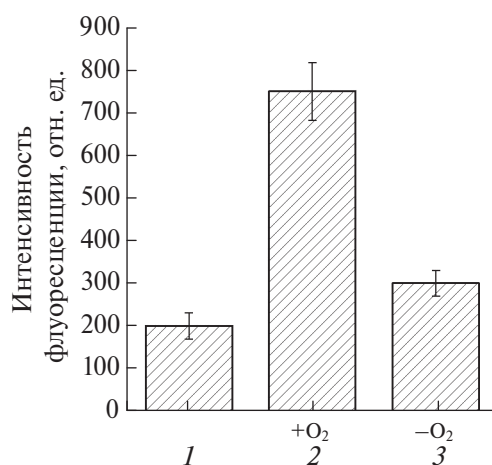


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции КПГ, связанных с Lb после инкубации с MG в течение 120 ч: исходный раствор белка без MG (1), с MG в присутствии кислорода + O₂ (2), с MG в среде без кислорода – O₂ (3).

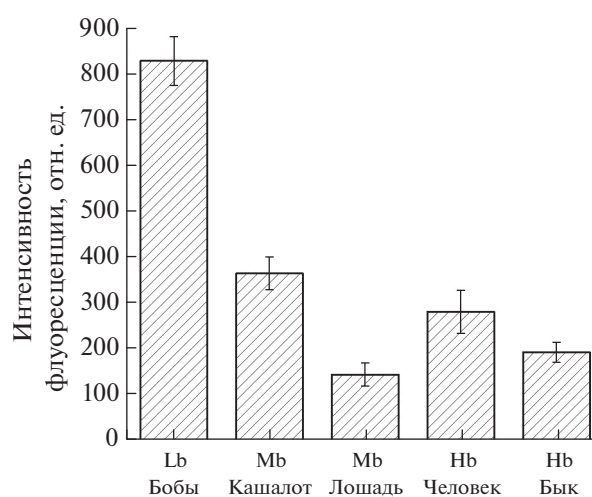


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции КПГ, связанных с различными белками после инкубации с MG в течение 96 ч.

на 35%. Самая низкая активность GLb была отмечена к 96 ч инкубации, для GHb человека к 72 ч, для GHb быка к 48 ч. При этом пероксидазная активность Mb либо не изменялась, либо незначительно возрастала.

Обсуждение полученных результатов. Первым белком, для которого было показано неферментативное гликирование, был гемоглобин. Hb — долгоживущий белок, время его существования в эритроците 120 ± 20 дней. Этого достаточно, чтобы глюкоза прореагировала с аминогруппой N-концевого остатка валина β -субъединицы и образовала стабильный комплекс (HbA1c). Поскольку доля HbA1c отражает уровень глюкозы в крови за период 4–6 недель, его используют в качестве

молекулярного маркера при диагностики сахарного диабета [23].

Помимо сахаров, в реакцию неферментативного гликирования могут вступать α, β -дикарбонильные соединения — глиоксаль и метилглиоксаль, гликирующая активность которых в 20 тысяч раз превосходит активность глюкозы [9]. Особое внимание заслуживает MG, который реагирует с аминок- и имидазольными группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные КПГ: карбоксиэтиллизин, карбоксиметиллизин, имидазолон, аргпиримидины и перекрестно-сшитые димеры лизина с метилглиоксаль (MOLD — methylglyoxal-derived lysine dimers) [9, 24]. Такие модификации необратимы и приводят к изменению структуры, конформации, заряда и, как следствие, к дисфункции белка [25].

Наиболее хорошо изучено гликирование *in vitro* метилглиоксаль эритроцитарного Hb человека (HbA0). В работах [3, 26, 27] было охарактеризовано влияние MG на его структуру и функцию. По сравнению с нативным Hb гликированный (GHbA0) имел более низкое оптическое поглощение при 280 нм, пониженную флуоресценцию триптофана, повышенное содержание α -спиралей, менее гидрофобную поверхности и стабильную четвертичную структуру. Высвобождение железа из гема под действием H₂O₂ и последующее окисление у GHbA0 протекали менее интенсивно. GHbA0 был термически более стабилен. Идентифицированы сайты модификации и природа образуемых КПГ.

Пероксидазная активность гликированного GHbA0 была ниже, чем у HbA0. В работах [3, 26] было показано, что при модификации человеческого Hb метилглиоксаль в основном образуются гидроимидазолоновые производные остатков аргинина. При этом степень модификации этих остатков зависела от их доступности для растворителя. По данным работы [28] в Hb, обработанном MG, модификации подвергались остатки лизина и аргинина. Некоторые из этих модификаций были идентифицированы у Hb, выделенного из крови человека [28]. У пациентов с плохо контролируемым сахарным диабетом 2 типа содержание карбоксиметилированных производных лизина и аргинина с гидроимидазолоном сильно превышало их количество у здоровых людей. Таким образом, определенные модификации Hb могут быть маркерами для оценки повреждения белков метилглиоксаль в организме [26]. Очень легко гликируется Lys-66 β , расположенный в гемовом кармане. Поскольку этот лизин участвует в связывании кислорода, его модификация может быть причиной снижения кислородсвязывающих свойств Hb [29] и изменения присущих ему ферментативных активностей.

Было исследовано и влияние MG на изменение структурных и физико-химических свойств миоглобинов [30–33]. Изучение Mb, гликирован-

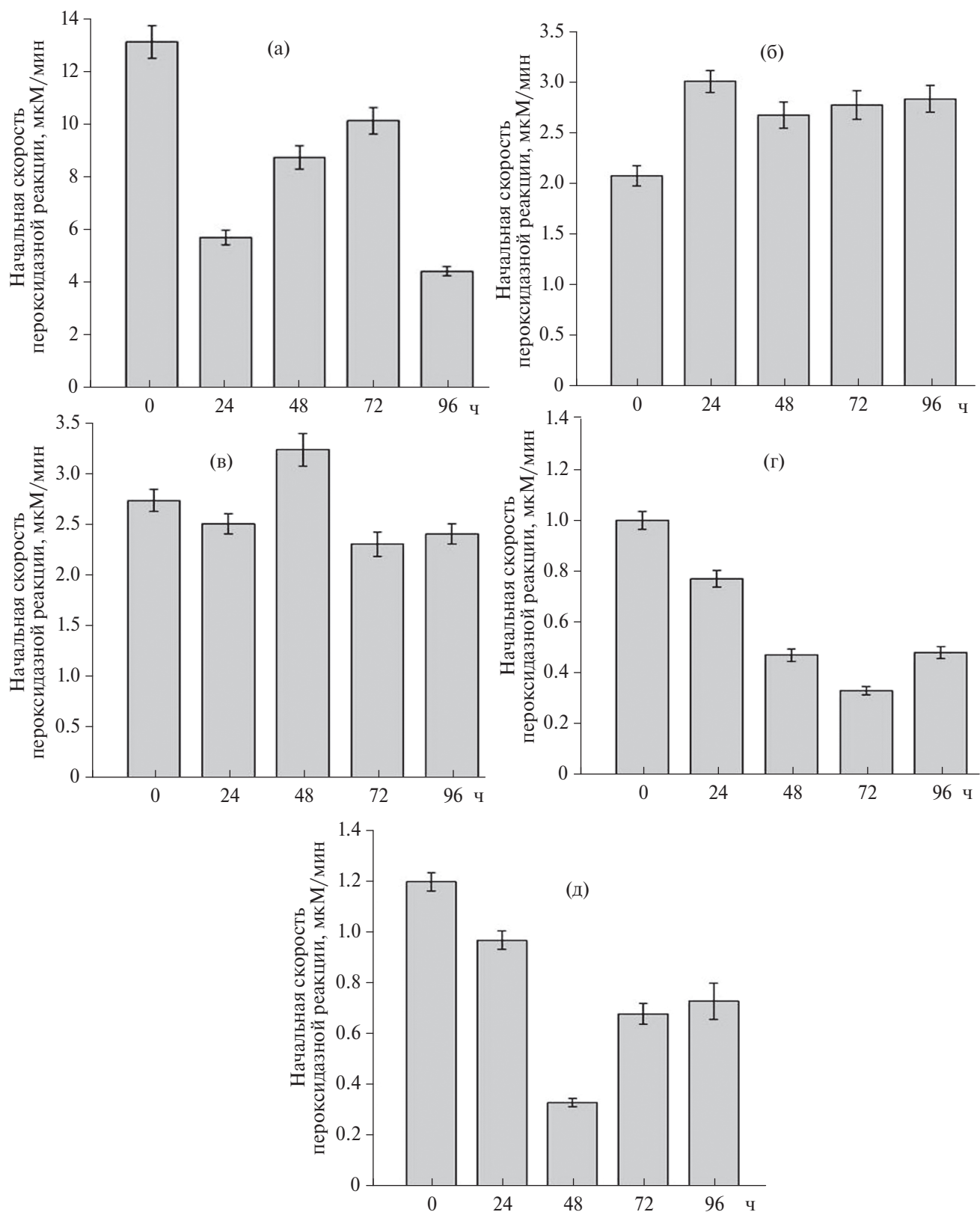


Рис. 7. Peroxidase activity of modified methylglyoxal hemoglobin proteins: Lb from bean tubers (a), Mb from horse muscle (б), Mb from horse heart (в), Hb from human erythrocytes (г), Hb from cow erythrocytes (д).

ного глюкозой, D-рибозой, 3-дезоксиглюкозоном и MG, показало, что КППГ, как и в случае Hb, чаще всего образуются по остаткам лизина и аргинина. В реакции Mb с MG модификации подвергается около половины (56%) всех остатков лизина [34]. Гликирование остатков лизина приводит к образованию бис(лизил)имидазольевых поперечных связей. Длительная инкубация Mb с MG вызывает высвобождение гема, изменение флуоресценции триптофана, снижение α -спирали, увеличение содержания β -слоя [31, 33, 34]. Эти изменения вызывают образование амилоидоподобных агрегатов Mb.

Для Mb сердца лошади также было показано, что основными сайтами гликирования являются остатки лизина и аргинина, причем при увеличении времени инкубации до 14 сут образуются дополнительные КППГ. Масс-спектрометрические исследования выявили модификации в двух специфических остатках лизина: Lys-87 и Lys-133 [32]. Эритроцитарный Hb, миоглобин и Lb являются “лизин-богатыми белками”, у которых количество остатков лизина находится в диапазоне от 7 до 12 на субъединицу или молекулу белка. При увеличении времени инкубации с MG происходило постепенное снижение доли α -спиралей [32]. Кроме того, модификация MG влияла на третичную структуру и гидрофобность белка. Было показано, что GMb имел более высокую электрофоретическую подвижность при электрофорезе в ПААГ и повышенное оптическое поглощение в области 280 нм [30].

Остатки лизина являются положительно заряженными основными аминокислотами и часто расположены на поверхности белков. Благодаря высоким значениям рКа они создают стабильное электростатическое и ионное взаимодействие [35], что обеспечивает стабильность и растворимость молекулы белка [35, 36]. Например, Mb ныряющих млекопитающих имеет большой положительный заряд, который вызывает электростатическое отталкивание белковых молекул и делает белок растворимым даже при очень высоких концентрациях в мышечных клетках [37]. Функция лизина в Lb в литературе не обсуждалась. По аналогии с Mb можно предположить, что остатки лизина в Lb повышают его растворимость, при этом концентрация Lb в цитозоле растительной клетки достаточно велика (0.1–0.5 мМ) [38].

Предполагается, что гликирование остатков лизина в Lb может происходить как в естественной среде (в растительной клетке), так и в экспрессионной системе (бактерии, дрожжи) [18]. Гликирование может быть причиной снижения растворимости Lb и образования ковалентно-сшитых агрегатов, что приводит к снижению эффективности азотфиксации в клубеньках и образованию телец включения при экспрессии рекомбинантного Lb. Известно, что некоторые остатки лизина в белках могут

функционировать как “горячие точки” гликирования (glycation hotspots), с помощью которых регулируется функция и продолжительность жизни белка [39]. Наличие таких горячих точек показано в растительном и ризобиальном протеомах корневых клубеньков фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) [40].

Самая известная функция гемоглибиновых белков – запасание и транспорт O_2 , но они могут проявлять и ряд ферментативных активностей [41], в том числе эстеразную [42] и пероксидазную [14, 43]. Именно пероксидазная активность была первой, описанной для этих белков [44], а в работе [45] была описана пероксидазная (псевдопероксидазная, как ее называли авторы статьи) активность Lb сои в сравнении с Mb кашалота. Максимальная скорость пероксидазной реакции с гваяколом для Lba была в 7 раз больше, чем для Mb. В настоящей работе скорость пероксидазной реакции Lb была примерно в 6 раз выше, чем у миоглобинов, и в 10–13 раз выше, чем у гемоглобинов. Это связано с рядом структурных особенностей Lb, таких как гидрофобное окружение гема, подвижность имидазольного кольца дистального гистидина, лабильность порфирина и наличие остатков аргинина и аспарагина, осуществляющих связывание и ориентирование субстратов.

Гликирование *in vitro* приводит к увеличению эстеразной активности Hb и Mb за счет увеличения сродства белка к субстрату и скорости реакции [21]. Большая эстеразная активность была показана для HbA1c по сравнению с HbA0 [21]. Напротив, гликирование снижало пероксидазную активность HbA0 [19, 22]. При этом гликированный Mb сердца лошади проявлял большую пероксидазную активность, чем нативный, что коррелировало с образованием феррилмиоглобина в реакции с H_2O_2 [20].

Гликирование может приводить к накоплению белков с неправильным фолдингом, агрегирующих с образованием амилоидоподобных структур, откладывающихся в межклеточном пространстве и внутри клетки при различных заболеваниях [46]. Эритроцитарный Hb как долгоживущий белок особенно склонен к такой агрегации. Модификация глиоксалем, трансформируя α -спирали в β -слои, усиливает амилоидогенный потенциал Hb [47–49]. Поскольку гликирование приводит к высвобождению гема и железа из белков, то гликированные Hb и Mb представляют серьезную угрозу при поступлении в кровоток [20, 48, 50]. Такое железо участвует в продукции свободных радикалов в реакции Фентона, что усиливает окислительный стресс, особенно у больных диабетом [20, 48]. Гликирование ускоряет автоокисление охуMb, в результате которого образуется супероксидный анион-радикал [20]. Его образование могут катализировать локализованные на гликированных белках катион-радикалы оснований Шиффа, выступающие как доноры электронов [17, 18].

Изучение процесса гликирования поможет лучше понять молекулярные механизмы ожирения, диабета, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, почечной недостаточности, старения и рака, при которых увеличивается доля гликированных белков. Выявление особенностей этого процесса важно и для биотехнологии. В частности, полученные результаты могут быть полезны для разработки эффективной технологии получения стабильных и растворимых рекомбинантных гемоглобинов, в том числе Lb, например, при производстве так называемого “растительного мяса”. Чужеродные белки могут подвергаться посттрансляционным модификациям, среди которых не последнее место занимает неферментативное гликирование [16]. Это влияет как на свойства белков, так и на состояние экспрессионной системы. Показано, что экспрессия гена Lb в клетках *E. coli* влияет на состояние бактериальной клетки при окислительном и нитрозативном стрессе [51], а поскольку рекомбинантный Lb может быть гликирован [16], то изучение этого процесса поможет повысить устойчивость экспрессионной системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nigro C., Leone A., Fiory F., Prevenzano I., Nicolò A., Mirra P. et al.* // *Cells*. 2019. V. 8. № 7. e749. <https://doi.org/10.3390/cells8070749>
2. *De la Maza M.P., Garrido F., Escalante N., Leiva L., Barrera G., Schnitzler S. et al.* // *Journal of Diabetes Mellitus*. 2012. V. 2. № 2. P. 221–226.
3. *Banerjee S., Chakraborti A.S.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 95. P. 1159–1168.
4. *Reddy V.P., Aryal P., Darkwah E.K.* // *Microorganisms*. 2022. V. 10. № 9. e1848. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091848>
5. *Nakamura A., Kawaharada R.* // *Fundamentals of Glycosylation*. London, UK: IntechOpen, 2022. e97234. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97234>
6. *Mukunda D.C., Joshi V.K., Chandra S., Siddaramaiah M., Rodrigues J., Gadag S. et al.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 213. P. 279–296.
7. *Uceda A.B., Mariño L., Casanovas R., Adrover M.* // *Biophys. Rev.* 2024. V. 16. № 2. P. 189–218.
8. *Bhat L.R., Vedantham S., Krishnan U.M., Rayappan J.B.B.* // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 133. P. 107–124.
9. *Thornalley P.J.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1043. P. 111–117.
10. *Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 3. P. 273–289.
11. *Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Topunov A.F.* // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 2. e253. <https://doi.org/10.3390/antiox10020253>
12. *Stratmann B.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 11. e6186. <https://doi.org/10.3390/ijms23116186>
13. *Trujillo M.N., Galligan J.J.* // *Nat. Chem. Biol.* 2023. V. 19. № 8. P. 922–927.
14. *Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Topunov A.F.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. № 1. P. 44–52.
15. *Лебедева О.В., Узарова Н.Н., Березин И.В.* // *Биохимия*. 1977. Т. 42. № 8. С. 1372–1379.
16. *Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. № 3. P. 297–302.
17. *Yim M.B., Yim H.S., Lee C., Kang S.O., Chock P.B.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 928. № 1. P. 48–53.
18. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Topunov A.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 1. e168. <https://doi.org/10.3390/ijms24010168>
19. *Khoo U., Newman D.J., Miller W.K., Pricel C.P.* // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1994. V. 32. P. 435–440.
20. *Roy A., Sen S., Chakraborti A.S.* // *Free Radic. Res.* 2004. V. 38. № 2. P. 139–146.
21. *Sen S., Bose T., Roy A., Chakraborti A.S.* // *Mol. Cell Biochem.* 2007. V. 301. № 1–2. P. 251–257.
22. *Ghosh P., Sen S., Bose U.B., Mandal S., Biswas I.B., Biswas U.K., Saha P.* // *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*. 2023. V. 4. № 1. P. 17–26.
23. *Pohanka M.* // *Biosensors (Basel)*. 2021. V. 11. № 3. e70. <https://doi.org/10.3390/bios11030070>
24. *Rabbani N., Thornalley P.J.* // *Amino Acids*. 2012. V. 42. P. 1087–1096.
25. *Thornalley P.J.* // *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 2008. V. 23. P. 125–150.
26. *Gao Y., Wang Y.* // *Biochemistry*. 2006. V. 45. № 51. P. 15654–15660.
27. *Bose T., Bhattacharjee A., Banerjee S., Chakraborti A.S.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 529. № 2. P. 99–104.
28. *Chen H.J., Chen Y.C., Hsiao C.F., Chen P.F.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2015. V. 28. № 12. P. 2377–2389.
29. *Friess U.* // *Clinical Chemistry*. 2003. V. 49. № 8. P. 1412–1415.

30. *Banerjee S., Chakraborti A.S.* // Protein J. 2013. V. 32. № 3. P. 216–222.
31. *Banerjee S., Maity S., Chakraborti A.S.* // Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2016. V. 155. P. 1–10.
32. *Banerjee S.* // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 193. Part B. P. 2165–2172.
33. *Banerjee S.* // Vitam Horm. 2024. V. 125. P. 31–46.
34. *Raupbach J., Ott C., Koenig J., Grune T.* // Free Rad. Biol. Med. 2022. V. 152. P. 516–524.
35. *Ahmad N.N., Kamarudin N.H.A., Leow A.T.C., Abd. Rahman R.N.Z.R.* // Molecules. 2020. V. 25. № 17. e3858. <https://doi.org/10.3390/molecules25173858>
36. *Li S., Zheng Y., Xu P., Zhu X., Zhou C.* // Food Chem. 2018. V. 242. P. 22–28.
37. *Isogai Y., Imamura H., Nakae S., Sumi T., Takahashi K., Shirai T.* // iScience. 2021. V. 24. № 8. e102920. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102920>
38. *Davies M.J., Mathieu C., Puppò A.* // Adv. Inorg. Chem. 1999. V. 46. P. 495–542.
39. *Thornalley P.J., Rabbani N.* // Semin. Dial. 2009. V. 22. № 4. P. 400–404.
40. *Matamoros M.A., Kim A., Peñuelas M., Ihling C., Griesser E., Hoffmann R. et al.* // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 1510–1528.
41. *Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 6. P. 563–587.
42. *Elbaum D., Nagel R.L.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 5. P. 2280–2283.
43. *Alayash A.I., Wilson M.T.* // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 9. e910795. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.910795>
44. *Keilin D., Hartree E.F.* // Nature. 1950. V. 166. № 4221. P. 513–514.
45. *Sievers G., Rönnberg M.* // Biochim. Biophys Acta. 1978. V. 533. № 2. P. 293–301.
46. *Sirangelo I., Iannuzzi C.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 12. e6609. <https://doi.org/10.3390/ijms22126609>
47. *Iram A., Alam T., Khan J.M., Khan T.A., Khan R.H., Naeem A.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. e72075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072075>
48. *Esackimuthu P., Saraswathi N.T.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021. V. 534. P. 387–394.
49. *Nascimento A.L.A., Guimarães A.S., Rocha T.D.S, Goulart M.O.F., Xavier J.A., Santos J.C.C.* // Vitam. Horm. 2024. V. 125. P. 183–229.
50. *Lee J.H., Samsuzzaman M., Park M.G., Park S.J., Kim S.Y.* // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 187. P. 409–421.
51. *Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F.* // Molecules. 2021. V. 26. № 23. e7207. <https://doi.org/10.3390/molecules26237207>

Glycation of Leghemoglobin by Methylglyoxal in Comparison with Other Hemoglobins and Influence on Their Peroxidase Activity

E. I. Nasybullina^a, O. V. Kosmachevskaya^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*

Non-enzymatic glycation is an irreversible posttranslational protein modification, which leads to a violation of physico-chemical properties and functions. Glycation most often affects lysine and arginine residues. Since hemoglobins contain many lysine residues (average 9%), they are often targets for glycation agents glyoxal and methylglyoxal (MG). A comparative study of the susceptibility for glycation of leghemoglobin (Lb) from bean nodules (*Vicia faba* L.), myoglobins (Mb) from sperm whale muscles and horse heart, and hemoglobins (Hb) from bovine and human erythrocytes was carried out. The level of glycation was defined by the autofluorescence of protein-bound advanced glycation end products (AGEs). The glycation level of Lb was 2.5 times higher than of sperm whale Mb and human Hb and 5 times higher than of horse Mb and bovine Hb. Lb glycation level depended on the presence of oxygen in the medium. Under microaerobic conditions, amount of AGEs formed was 3 times lower than in oxygen-containing environment, and the degradation of heme group was also slower. Glycation also affected the peroxidase activity of hemoproteins. Initial rate of Lb peroxidase reaction was 6 times higher than of myoglobins and 10–13 times higher than of hemoglobins. Glycation decreased the rate of Lb and hemoglobins peroxidase reaction, while for myoglobins it did not change or increased depending on incubation time with MG.

Keywords: leghemoglobin, hemoglobin, myoglobin, methylglyoxal, non-enzymatic glycation, peroxidase activity