

УДК 661.982:547.963.4

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА ЗАЩИЩАЮТ ГЕМОГЛОБИН И ЭРИТРОЦИТЫ ОТ ДЕЙСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЕЙ**О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, И.С. Пугаченко, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов***Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия***Введение**

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одной из физиологических форм оксида азота (NO) в организме. Они осуществляют депонирование и перенос NO от места образования к биологическим мишеням [1–4]. Образование этих комплексов было зарегистрировано у животных (в том числе, у человека), растений и бактерий. Низкомолекулярные ДНКЖ в живых системах в качестве лигандов обычно содержат цистеин и глутатион [3, 4]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-GS) образуются в организме человека в качестве стабильных доноров NO. ДНКЖ-GS всегда существуют в равновесии с белок-связанными ДНКЖ, которые, как правило, формируются при участии белковых тиолов. ДНКЖ-GS обладают широким спектром биологических активностей: оказывают гипотензивное и сосудорасширяющее действие, уменьшают зону инфаркта в изолированном сердце, ингибируют агрегацию тромбоцитов, ускоряют заживление кожных ран, подавляют эндометриоз и апоптоз в культивируемых клетках животных.

Ранее нами было показано, что помимо участия в метаболизме NO, ДНКЖ могут функционировать как антиоксиданты. В частности, антиоксидантное действие ДНКЖ-GS было продемонстрировано по отношению к гемоглобину (Hb) и миоглобину [5–7]. ДНКЖ защищали входящие в их состав тиоловые группы белков от окисления [5, 6], восстанавливали оксоферрильную форму Hb до нетоксичной метформы [7]. Поскольку в эритроцитах есть пул лабильного железа и высока концентрация глутатиона, то высока вероятность образования ДНКЖ, связанных с SH-группой глутатиона и Cys-93β гемоглобина [5, 6]. Как известно, эритроциты часто подвержены действию окислителей, продуцируемых как внутри клетки, так и вне – клетками иммунной системы. Поэтому целью работы было изучение влияния низкомолекулярных и связанных с белком ДНКЖ на окислительную модификацию Hb и эритроцитов.

Материалы и методы

ДНКЖ с фосфатными лигандами синтезировали в пробирке Тунберга, пропуская газообразный NO через смесь, содержащую FeSO₄ и 100 мМ Na, К-фосфатный буфер (рН 6,8) в качестве источника фосфатного лиганда. ДНКЖ-GS получали добавлением восстановленного глутатиона (GSH) к менее стабильным ДНКЖ с фосфатом в молярном соотношении 2 : 1. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота. Способность GS-ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления дигидрорадамина пероксинитритом, образующимся при распаде 3-морфолиносиндонимина (SIN-1). При окислении дигидрорадамина образуется родамин с максимумом поглощения при 500 нм. Количественную оценку карбонильных производных Hb проводили по методу [8], суть которого заключается в формировании ковалентных аддуктов с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), которые регистрируются спектрофотометрически. Концентрацию гема в растворе Hb определяли с помощью пиридингемохромного метода [9]. Состояние остатков триптофана и тирозина изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Для селективного возбуждения автофлуоресценции триптофана использовали длину волны 295 нм. Флуоресценцию регистрировали при 330 нм. Спектрофотометрическую детекцию 3,3'-дитирозинов осуществляли при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 400 нм. Появление оксоферрил-формы Hb (Hb-Fe^{IV}=O) определяли по снижению оптического поглощения при 630 нм и возрастанию при 530 и 560 нм. SDS-электрофорез проводили в блоках 12 % РААG размером 15×15×1 мм. Эритроциты человека выделяли из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия, и промывали двукратным центрифугированием при 350 g в Na, К-фосфатный буфере, содержащем 10 мМ Na₂ HPO₄/KH₂ PO₄, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (рН 7,4). За лизисом эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензий клеток (клеток/мл) при 670 нм. Лизис инициировали добавлением к суспензиям эритроцитов либо 0,1–1 мМ HOCl, либо H₂ O₂ после их 2-минутной преинкубации с миелопероксидазой (50 нМ). Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) регистрировали при 25 °С на ЭПР-спектрометре X-диапазона E-109E (Varian, США).

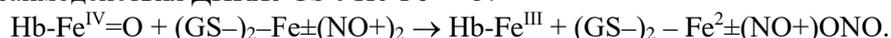
Результаты и обсуждение

Влияние ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина. ДНКЖ, содержащие фосфатные ионы (ДНКЖ- PO_4^-) и глутатион (ДНКЖ-GS) в качестве лигандов, в равной степени ингибировали восстановление дигидрородамина пероксинитритом, образуемым в ходе декомпозиции SIN-1. ДНКЖ-GS и ДНКЖ, связанные с Hb (Hb-ДНКЖ), оказывали выраженное ингибирующее действие на окислительную модификацию Hb пероксинитритом. Hb-ДНКЖ защищали белок в широком диапазоне концентраций ONOO⁻ (от 0,38 до 4,20 мМ), что соответствует молярному соотношению Hb : ONOO⁻ от 1 : 2,5 до 1 : 28 (в расчете на тетрамер). При концентрации ONOO⁻ 1 мМ (соотношение 1 : 6,5) карбонильных производных в случае Hb-ДНКЖ было на 80 % меньше, чем в контрольном образце белка, содержащем свободные SH-группы. Еще более выраженное защитное действие на белок оказывали ДНКЖ-GS. Зависимость образования карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии ДНКЖ имела двухфазный характер: при низких концентрациях ONOO⁻ образование карбонильных производных происходило медленно, начиная с концентрации 1,6 мМ – интенсивно. Вероятно, этот эффект связан с высвобождением из распавшихся ДНКЖ железа, которое участвует в генерации свободных радикалов в ходе реакции Фентона. С помощью спектроскопии ЭПР было показано, что при концентрации ONOO⁻ 1,6 мМ большая доля комплексов распадается.

ДНКЖ, как связанные с белком, так и низкомолекулярные, препятствовали разрушению гемовой группы Hb. В контрольных образцах доля разрушенного гема находилась в прямой зависимости от концентрации окислителя. При концентрации ONOO⁻ 4,2 мМ разрушалось 50 % гемов, в то время как в присутствии ДНКЖ – только 25 %.

Разрыву порфиринового кольца предшествует стадия образования оксоферрил-формы гемоглобина (Hb- $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). В образовании оксоферрилHb ключевую роль играет гемовое железо, катализирующее разрыв O-O связи в комплексе Hb- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}$ [10]. Появление оксоферрил-формы Hb наблюдали у всех изученных форм Hb.

Защитное действие ДНКЖ можно объяснить несколькими возможными механизмами. Во-первых, ДНКЖ выступают донорами NO, который может вступать в реакцию с Hb- $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ с образованием комплекса Hb- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}$, распадающегося далее до нитрита и ферри-формы Hb [11]: $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{NO} \rightarrow \text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-ONO} \rightarrow \text{Hb-Fe}^{\text{III}} + \text{NO}_2$. В работе [7] нами был предложен аналогичный механизм для взаимодействия ДНКЖ-GS с Hb- $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$:



Интермедиат Hb- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}$ в присутствии низкомолекулярных тиолов вновь восстанавливается до ДНКЖ. Таким образом, ДНКЖ выступают как катализаторы восстановления оксоферрилгема тиолами. Во-вторых, включение ионов железа, высвободившихся при распаде гема, в состав ДНКЖ, препятствует их участию в катализе гомолитического расщепления пероксинитрита с образованием свободнорадикальных продуктов. В-третьих, ДНКЖ могут непосредственно взаимодействовать с органическими свободными радикалами [7]. Это сопровождается необратимой деструкцией комплексов и образованию интермедиатов – нитроорганических соединений.

Оксоферрильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопroteидов [12]. Поэтому было проведено спектрофлуориметрическое исследование окисления тирозиновых и триптофановых остатков пероксинитритом. В контрольном варианте и в Hb-ДНКЖ с увеличением концентрации ONOO⁻ возрастала флуоресценция при 400 нм, что свидетельствует об образовании 3,3'-дитирозина. Однако начиная с концентрации 1,6 мМ, флуоресценция в Hb-ДНКЖ начала снижаться, что может быть связано с образованием 3-нитротирозина. В экспериментах с ДНКЖ-GS результаты были другими. Флуоресценция возрастала только начиная с 1,6 мМ ONOO⁻. Этот лаг-период в окислении тирозиновых остатков можно объяснить действием в образцах ДНКЖ-GS примесного глутатиона, который является эффективным перехватчиком $\text{NO}_2\cdot$ ($k = 5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [12]. К тому же глутатион может непосредственно восстанавливать пероксинитрит по двухэлектронному механизму.

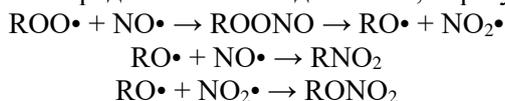
Мишенью атаки ONOO⁻ в Hb являются остатки триптофана [13]. В контрольном варианте интенсивность флуоресценции при 327 нм линейно уменьшалась, что свидетельствует об окислении / нитровании триптофановых остатков. В Hb-ДНКЖ при низких концентрациях окислителя флуоресценция возрастала и только начиная с концентрации 1,6 мМ начинала снижаться.

Восстановление феррильного интермедиата в результате реакции с близкорасположенными аминокислотами, может привести к образованию радикалов аминокислотных остатков, которые способствуют возникновению межмолекулярных поперечных связей и формированию агрегатов белка [10]. Образование агрегатов белка под действием ONOO⁻ регистрировали с помощью SDS электрофореза в ПААГ. В контрольном варианте во всем диапазоне концентраций ONOO⁻ происходило дозозависимое образование димеров и высокомолекулярных агрегатов Hb. В случае, если SH-группы были включены как лиганды в ДНКЖ, агрегация белка наблюдалась только при концентрации ONOO⁻ 2,6 мМ и 4,2 мМ и в меньшей степени, чем в контрольном образце. В эксперименте с ДНКЖ-GS степень сшивания белка была практически такой же, как в Hb-ДНКЖ.

Влияние ДНКЖ на окислительный гемолиз эритроцитов. Эритроциты человека широко используются в качестве модели для изучения общих механизмов повреждения клеток в условиях фагоцитарно-индуцированного окислительного стресса. Протекторное действие ДНКЖ исследовали на отмытых эритроцитах человека, выделенных из донорской крови. Лизис эритроцитов вызывали либо обработкой суспензии эритроцитов HOCl, либо добавлением к суспензии эритроцитов синтезирующей HOCl миелопероксидазы в присутствии ее специфических субстратов (H₂O₂ и хлорид). Кинетику лизиса эритроцитов оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при 670 нм. После обработки эритроцитов ДНКЖ-GS их устойчивость к HOCl значительно возрастала, в то время как скорость индуцированного HOCl лизиса снижалась с увеличением концентрации ДНКЖ-GS, что приводило к полному ингибированию лизиса при 50 мкМ ДНКЖ-GS. При 2,5 мкМ GS-ДНКЖ (что соответствует 5 мкМ GSH) скорость лизиса эритроцитов, индуцированного HOCl, снижалась более чем в 20 раз. Миелопероксидаза также индуцировала лизис эритроцитов. Добавление 0,5 мкМ ДНКЖ-GS в инкубационную среду ингибировало этот процесс, а при 2,5 мкМ ДНКЖ практически полностью его предотвращало. Эти данные свидетельствуют о том, что ДНКЖ-GS в условиях моделируемого окислительно-галогенирующего стресса проявляют выраженный цитопротекторный эффект.

Одной из наиболее частых причин повреждения эритроцитов гипогалогеновыми кислотами является активация свободнорадикального перекисного окисления липидов. Ранее было установлено, что при взаимодействии HOCl с органическими гидропероксидами (трет-бутилгидропероксид, гидропероксид линолевой кислоты) образуются алкилпероксильные и алкоксильные радикалы [14].

В результате взаимодействия спиновой ловушки DEPMPO со свободнорадикальными интермедиатами реакции t-BOOH с HOCl образовывались аддукты, которые детектировали с помощью ЭПР-спектроскопии. Добавление ДНКЖ-GS в реакционную среду приводило к исчезновению спиновых аддуктов DEPMPO, причем антирадикальное действие ДНКЖ-GS было значительно более выраженным, чем в случае свободного GSH. Этот эффект можно объяснить взаимодействием алкилпероксильных и алкоксильных радикалов с оксидом азота, образующимся из ДНКЖ:



Эти диффузно-контролируемые реакции (константа скорости $k = 1-3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) приводят к полному ингибированию цепных реакций свободнорадикального окисления [15, 16].

Заключение

ДНКЖ с глутатионовыми лигандами и Hb-ДНКЖ эффективно защищали Hb от окислительной модификации. Они препятствовали образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, деградации гемовой группы, а также образованию межбелковых сшивок. ДНКЖ-GS в микромолярных концентрациях эффективно ингибировали лизис эритроцитов, индуцированный HOCl, и проявляли способность удалять алкоксильные и алкилпероксильные радикалы, образующиеся в реакции HOCl с пероксидом трет-бутила.

ДНКЖ оказались более эффективными цитопротекторами и поглотителями органических свободных радикалов, чем восстановленный глутатион.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052).

Литература

1. Tsai M. – L., Tsou C. – C., Liaw W. – F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): from biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs. // *Acc. Chem. Res.* 2015. 48. 4. 1184–1193.
2. Hsiao H.Y., Chung C.W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.T. Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering. // *Dalton Trans.* 2019. Apr 16. doi: 10.1039/c9dt00777f.
3. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. // *Nitric Oxide.* 2016. 54. 15–29.
4. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living. / Cambridge Scholars Publishing. 2019. 265 P.
5. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // *Nitric Oxide.* 2008. 18. 37–46.
6. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // *Methods in Enzymology.* 2008. 436. 445–461.
7. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. // *Биохимия.* 2004. 69. 5. 699–705.
8. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина и тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II). // *Казанский медицинский журнал.* 2014. 95. 4. 553–557.
9. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. // *Methods in Enzymology.* 1981. 76. 5–29.
10. Herold S., Rehmann F. – J.K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // *Free Rad. Biol. Med.* 2003. 34. 531–545.
11. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. // *J. Biol. Chem.* 2003. 278. 45. 44049–44057.
12. Ford E., Hughes M.N., Wardman P. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. // *Free Radic. Biol. Med.* 32. 2002. 1314–1323.
13. Pietraforte D., Minetti M. One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals. // *Biochem J.* 1997. 321. 734–750.
14. Osipov A.N., Panasenko O.M., Chekanov A.V., Arnhold J. Interaction of tert – butyl hydroperoxide with hypochlorous acid. A spin trapping and chemiluminescence study. // *Free Radical Research.* 2002. 36. 7. 749–754.
15. O'Donnell V.B., Chumley P.H., Hogg N., Bloodsworth A., Darley-Usmar V.M., Freeman B.A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with α -tocopherol. // *Biochemistry.* 1997. 36. 49. 15216–15223.
16. Chamulitrat W. EPR studies of nitric oxide interactions of alkoxy and peroxy radicals in *in vitro* and *ex vivo* model systems. // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2001. 3. 2. 177–187.