

УДК 546.173:547.444.2

АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИГЛИКИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ НИТРОКСИЛА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ С МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ¹ Э.И. Насыбуллина, ¹ И.С. Пугаченко, ¹ О.В. Космачевская, ² Н.Н. Новикова, ¹ А.Ф. Топунов¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия² НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия**Введение**

Понятие «карбонильный стресс» в биологическую науку ввел Бейнс в 1991 году [1]. Оно аналогично понятию «окислительный стресс». Под карбонильным стрессом понимают повышение концентрации восстанавливающих сахаров (глюкозы, дезоксиглюкозы, фруктозы, рибозы и триозофосфатов) и активных карбонильных соединений (АКС), которое приводит к увеличению скорости образования конечных продуктов гликирования (КПГ).

В биологических образцах идентифицировано более 20 активных альдегидов и кетонов, основными из которых являются глиоксаль, метилглиоксаль (MG), 3-деоксиглюкозон и малоновый диальдегид. Наибольшей гликирующей активностью обладают α , β -дикарбонильные соединения – глиоксаль и MG. Особое внимание заслуживает MG, действие которого обусловлено способностью вступать в реакции с amino- и SH-группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные КПГ [2, 3]. Такие модификации изменяют структуру, заряд и конформацию белка, вследствие чего нарушается его функция и способность к протеолитической деградации.

Карбонильному стрессу подвержены и бактериальные клетки в условиях резкого перехода на субстраты с высокой концентрацией углеводов или в стационарной фазе [5]. Избыточное образование активных форм кислорода (АФК) может быть еще одним механизмом развития карбонильного стресса в прокариотической клетке. Впервые неферментативное гликирование белков в бактериях было показано в работах Мироновой с соавт. [6, 7]. Затем Пеппер обнаружил увеличение количества гликированных белков при выращивании *Escherichia coli* в стационарной фазе и при добавлении глюкозы к среде LB [8]. Нам удалось выделить неферментативно гликированный легоглобин (гемоглобин бобовых растений) из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном этого белка [9]. Карбонильный стресс тесно связан с окислительным [10–12]. При взаимодействии аминокислот с MG образуются свободнорадикальные интермедиаты: катион-радикал основания Шиффа и анион-радикал MG (семидион) [11]. При наличии кислорода в среде анион-радикал MG может восстанавливать кислород до супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$) [11]. Образующийся в аэробной среде $O_2^{\cdot-}$ инициирует цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), при которых образуются новые активные карбонильные соединения [11, 13, 14]. Таким образом, карбонильный стресс способствует развитию окислительного стресса и, наоборот, окислительный стресс усиливает карбонильный.

В настоящее время ведется поиск новых препаратов, которые могли бы ингибировать реакции неферментативного гликирования. Считается, что основные механизмы ингибирования гликирования связаны с удалением карбонильных и радикальных соединений, которые увеличивают образование КПГ, а также с хелатированием ионов металлов, таких, как железо и медь.

В различных экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было показано, что оксид азота (NO) и его доноры ингибируют образование КПГ [12, 15–18]. Антигликирующее действие NO во многом обусловлено его антиоксидантными и антирадикальными свойствами [19, 20]. Еще более сильным антиоксидантом является нитроксил (HNO) – продукт одноэлектронного восстановления и протонирования NO. Мы предполагаем, что этот метаболит NO может влиять на реакции неферментативного гликирования биомолекул.

Нитроксил имеет короткое время жизни. Поэтому в исследовательских целях и в фармакологии используют молекулы-доноры, которые выделяют HNO в ответ на внешние стимулы. Наиболее часто используемые доноры HNO – соль Ангели (триоксодинитрат натрия) и кислота Пилоти (N-гидроксibenзолсульфонамид). Эти доноры HNO хорошо себя зарекомендовали в лечении алкоголизма, сердечно-сосудистых заболеваний и рака [21]. Особенно перспективно их использование в качестве кардиопротекторных средств, поскольку они обладают гипотензивным действием, а также способны улучшать сократимость миокарда и ингибировать его гипертрофию [22, 23].

Целью работы – исследовать защитное действие нитроксила на белки и клетки *E. coli* в условиях действия метилглиоксаля.

Материалы и методы

Окислительную модификацию гемоглобина (Hb) под действием пероксида трет-бутила (t-BOOH) и MG оценивали по количеству образовавшихся карбонильных групп с помощью спектрофотометрической детекции аддуктов с 2,4-динитрофенилгидразином по методу [12]. Концентрацию гема определяли пиридингемохромовым методом. Образование межсубъединичных сшивок и агрегатов белка регистрировали с помощью денатурирующего SDS-электрофореза в 12 % ПААГ и жидкостной хроматографии на Toyopearl HW-55F. Неферментативно гликированный Hb получали в системе *in vitro* при инкубации в стерильных условиях с различными концентрациями MG в присутствии или в отсутствии доноров нитроксила в течении 1–4 суток при 37 °C. Непрореагировавший MG удаляли диализом. Степень гликирования Hb оценивали по флуоресценции КППГ ($\lambda_{\text{возб}} = 334$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 440$ нм). Антиоксидантное и антирадикальное действие донора нитроксила соли Ангели оценивали в реакции окисленного Hb (metHb) с t-BOOH с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции, а также по скорости образования оксоферрилHb ($\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$).

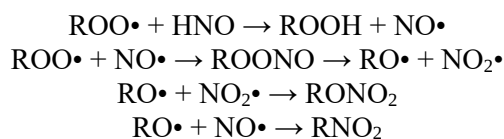
Эксперименты с бактериальными культурами проводили на клетках *E. coli* (штамм TB-1), которые высевали в жидкую питательную среду LB и культивировали на термошейкере при 37 °C. В начале логарифмической фазы роста вносили MG и / или соль Пилоти, длительно высвобождающую HNO. Концентрацию клеток в культуре измеряли по величине оптической плотности при OD₆₀₀. В белковом экстракте бактериальных клеток регистрировали автофлуоресценцию КППГ при $\lambda_{\text{возб}} = 325$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 492$ нм. Влияние MG и HNO на бактерии оценивали по восстановлению МТТ цитоплазматическими дегидрогеназами в нерастворимый формазан, количество которого коррелирует с метаболической активностью клеток и способностью к делению.

Результаты и обсуждение

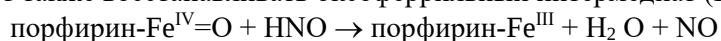
Влияние нитроксила на модификацию гемоглобина окислением и гликированием. В качестве объекта исследования был взят эритроцитарный гемоглобин (Hb), поскольку он в большей степени подвержен неферментативному гликированию. Донором нитроксила выступала соль Ангели, которую используют в фармакологических исследованиях.

Соль Ангели препятствовала образованию карбонильных производных Hb и деградации его гема под действием различных концентраций t-BOOH. Известно, что в реакции органических гидропероксидов с гемопротеидами образуются радикальные продукты ($\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$), которые вызывают окисление гема и аминокислотных остатков белка. Защитное действие HNO в этой системе скорее всего связано с его способностью нейтрализовать органические свободные радикалы.

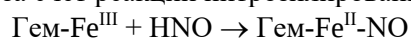
С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции было показано, что HNO дозозависимо снижает выход свободнорадикальных интермедиатов в реакции metHb ($\text{Hb}^{\text{III}}-\text{H}_2\text{O}$) с t-BOOH. Антирадикальное действие нитроксила можно объяснить его способностью вступать в реакцию с алкоксильными ($\text{RO}^\bullet$) и алкилпероксильными ($\text{ROO}^\bullet$) радикалами с образованием нитрозо- и нитропроизводных:



HNO может также восстанавливать оксоферрильный интермедиат ($\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$):



Эта способность нитроксила была подтверждена в экспериментах по восстановлению Hb – $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, который был получен добавлением небольшого избытка H_2O_2 . Непрореагировавшую перекись удаляли каталазой. Добавка соли Ангели в эквимольном количестве приводила к практически полному восстановлению $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ до metHb, о чем свидетельствовало снижение поглощения при 541 и 582 нм и увеличение при 631 нм, что характерно для metHb. Соль Ангели также замедляла образование $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ в системе окисления Hb пероксидом трет-бутила. Нитроксил также может замедлять образование $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ за счет реакции нитрозилирования metHb:



Мы предположили, что представленные выше реакции могут лежать в основе механизма антигликирующего действия HNO. Способность нитроксила купировать реакции неферментативного гликирования изучали в системе *in vitro* при инкубации метHb с высокой концентрацией MG (1 : 90 mM в расчете на субъединицы Hb). В этой системе нитроксил дозозависимо ингибировал образование флуоресцирующих КПП, причем HNO был более эффективен, чем аминоксидин (стандартное антигликирующее соединение). Нитроксил также снижал количество высокомолекулярных агрегатов субъединиц Hb, образующихся в реакции с MG.

Антигликирующее действие соли Ангели было менее выражено по отношению к гемовому комплексу Hb с азидом (Hb-Fe^{III}-N₃). Этот факт указывает на то, что антигликирующий эффект нитроксила во многом обусловлен действием HNO на железо гемовой группы.

Влияние нитроксила на клетки *E. coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса. Карбонильный стресс в бактериях *E. coli* индуцировали добавлением MG. В качестве донора нитроксила использовали кислоту Пилоти в концентрации, не ингибирующей рост бактерий. Поскольку биологический эффект нитроксила зависит от концентрации кислорода, в эксперименте использовали два типа культур: растущие в условиях нормальной аэрации (коэффициент заполнения колбы 0,17) и в условиях пониженной аэрации (коэффициент заполнения колбы 0,34). Добавление MG к среде культивирования приводило к полному подавлению роста низкоаэрируемых бактерий в период с 2 до 10 часов, в то время как в нормально аэрируемых культурах происходило только замедление роста. Также было различно и влияние донора HNO на бактериальные культуры. При низкой аэрации он проявлял цитопротекторное действие, а при нормальной аэрации эффект был противоположным.

В низкоаэрируемых культурах уровень связанных с белками КПП практически в два раза превышал их уровень в нормально аэрируемых. Это объясняется активацией гликолиза и связанной с этим повышенной продукцией MG. MG в обоих типах культур усиливал процессы образования КПП ~ на 25 %, в то время как нитроксил снижал ~ на 15 %. Более выражено антигликирующее действие нитроксила было в присутствии MG. В низкоаэрируемых культурах нитроксил снижал содержание КПП до уровня контроля.

Под действием MG жизнеспособность бактерий, оцениваемая по МТТ-тесту, в обоих типах культур была снижена: на 40 % в низкоаэрируемых и на 20 % – в нормально аэрируемых. Однако действие нитроксила на бактериальные культуры было разнонаправленным: цитопротекторное в первом случае и цитотоксическое – во втором. Цитопротекторное действие нитроксила может быть обусловлено снижением уровня ассоциированных с белками свободных радикалов и КПП, возникающих при взаимодействии аминокислотных остатков с MG. Цитотоксическое действие, вероятно, связано с образованием пероксинитрита в реакции с молекулярным кислородом.

Помимо непосредственного антиоксидантного или прооксидантного действия, HNO может влиять на метаболизм клетки за счет модификации железо-гемовых белков, а также белков, содержащих реакционноспособные тиолы и Fe-S-кластеры [24]. Причем HNO, в отличие от NO, может непосредственно взаимодействовать с тиолами, тиолсодержащими белками и окисленным гемовым железом. Влияние нитроксила на метаболизм может быть также связано с NO, который образуется либо в результате окисления HNO двухэлектронными окислителями, либо при восстановительном нитрозилировании гемопротеидов с участием HNO.

Заключение

С помощью различных физико-химических методов показано, что донор нитроксила соль Ангели обладает антиоксидантным и антирадикальным действием в системах, моделирующих окисление гемоглобина. Нитроксил замедлял образование карбонильных производных белка, межсубъединичных сшивок и деградацию гемовой группы. Также нитроксил снижал выход свободно-радикальных продуктов в реакции Hb с органической перекисью и с метилглиоксалем. Эти эффекты лежат в основе антигликирующего действия нитроксила по отношению к гемоглобину.

Донор нитроксила – кислота Пилоти снижал токсическое действие метилглиоксала на бактериальную культуру, что выражалось в увеличении жизнеспособности клеток и снижению автофлуоресценции связанных с белками продуктов неферментативного гликирования. Цитопротекторный эффект HNO в условиях карбонильного стресса может быть обусловлено его антиоксидантным и антигликирующим действием.

Антиоксидантное и антигликирующее действие нитроксила в сочетании с его кардио- и вазопротекторными свойствами может послужить основой для разработки фармакологических препаратов с синергетическим терапевтическим действием, которые будут эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при карбонильном стрессе.

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

Литература

1. Baynes J.W. // Diabetes. 1991. 40. 4. 405–412.
2. Rabbani N., Thornalley P.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. 1126. 124–127.
3. Rabbani N., Thornalley P.J. // Amino Acids. 2012. 42. 4. 1087–1096.
4. Thornalley P.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. 1043. 2. 111–117.
5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2015. 80. 13. 1655–1671.
6. Mironova R., Niwa T., Hayashi H., Dimitrova R., Ivanov I. // Mol. Microbiol. 2001. 39 4. 1061–1068.
7. Mironova R., Niwa T., Dimitrova R., Boyanov M., Ivanov I. // J. Biol. Chem. 2003. 278. 51. 51068–51074.
8. Pepper E. Mechanisms of long-term survival in Escherichia coli. / A Dissertation Presented to University of Southern California. For the Degree Doctor of Philosophy (Molecular Biology). 2007.
9. Kosmachevskaya O.B., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. 46. 3. 297–302.
10. Rosca M.G., Mustad T.G., Kinter M.T., Ozdemir A.M., Kern T.S., Szweda L.I., Brownlee M., Monnier V.M., Weiss M.F. // Am. J. Physiol. Renal. 2005. 289. 420–430.
11. Shumaev K.B., Gubkina S.A., Kumsikova E.M., Shepel'kova G.S., Ruuge E.K., Lankin V.Z. // Biochemistry (Moscow). 2009. 74. 4. 568–574.
12. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. // Clin. Chem. Lab. Med. 2014. 52. 1. 161–168.
13. Yim H.S., Kang S.O., Hah Y.C., Chock P.B., Yim M.B. // J. Biol. Chem. 1995. 270. 47. 28228–28233.
14. Lee C., Yim M.B., Chock B.P., Yim H.S., Kang S.O. // J. Biol. Chem. 1998. 273. 39. 25272–25278.
15. Bucala R., Cerami A., Tracey K.J. // J. Clin. Invest. 1991. 87. 432–438.
16. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. // Kidney International. 2000. 58. 4. 1780–1787.
17. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. // Hemoglobin. 2013. 37. 3. P. 205–218.
18. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Насыбуллина Э.И., Мартусевич А.К., Рууге Э.К. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. 6. 3. 494–497.
19. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenkov O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. 2019. e2798154.
20. 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. 15. 4. 313–319.
21. Fukuto J.M. // Br. J. Pharmacol. 2019. 176. 135–146.
22. Flores-Santana W., Salmon D.J., Donzelli S., Switzer C.H., Basudhar D., Ridnour L., Cheng R., Glynn S.A., Paolocci N., Fukuto J.M., Miranda K.M., Wink D.A. // Antioxid Redox Signal. 2011. 14. 9. 1659–1674.
23. Keceli G., Majumdar A., Thorpe C.N., Jun S., Tocchetti C.G., Lee D.I., Mahaney J.E., Paolocci N., Toscano J.P. // J. Gen. Physiol. 2019. 151. 758–770.
24. Bianco C.L., Toscano J.P., Bartberger M.D., Fukuto J.M. // Arch. Biochem. Biophys. 2017. V. 617. P. 129–136.