

УДК 577.19

**ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА
НА ГЕМОГЛОБИН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЕРОКСИНИТРИТОМ****Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов***Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются основной рабочей формой оксида азота (NO) в организме, осуществляющей депонирование NO и его перенос от места образования к биологическим мишеням [1–4]. Образование этих комплексов было зарегистрировано в организме человека, животных, растений и бактерий. За 30-ти летнюю историю активного изучения ДНКЖ было показано, что они обладают широким спектром биологических активностей, которые обусловлены высвобождающимся при их распаде NO.

Низкомолекулярные ДНКЖ в живых системах в качестве лигандов, как правило, 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.

Ранее было показано, что помимо участия в метаболизме NO, ДНКЖ могут функционировать как антиоксиданты. В частности, антиоксидантное действие ДНКЖ-GS было продемонстрировано на гемоглобине (Hb) и миоглобине. ДНКЖ защищали входящие в их состав тиоловые группы от окисления [5, 6], восстанавливали оксоферрил-форму миоглобина до нетоксичной метформы [7]. Защитное действие ДНКЖ по отношению к SH-группам было продемонстрировано и на пептиде глутатионе при его окислении HOCl [8]. Также была показана способность ДНКЖ-GS защищать эритроциты от HOCl-индуцированного гемолиза [8].

Поскольку в эритроцитах есть пул лабильного железа и высока концентрация глутатиона, то вероятно образование ДНКЖ, связанных с SH-группой глутатиона и Cys-93β гемоглобина [5, 6]. Как известно, в крови основной мишенью действия пероксинитрита (ONOO–) является гемоглобин [9]. Все эти факты послужили предпосылкой для планирования исследования по изучению влияния низкомолекулярных и связанных с белком ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина пероксинитритом. Источником пероксинитрита в крови являются макрофаги. Также этот окислитель может образовываться в самих эритроцитах в условиях гипоксии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что ДНКЖ способны перехватывать тиольные радикалы с образованием нерадикальных интермедиатов. С другой стороны, эти комплексы могут связывать ONOO– с участием железа и катализировать реакцию нитрования аминокислотных остатков или липидов, таким образом останавливая реакции свободнорадикального окисления.

Принимая это во внимание, мы решили исследовать способность ДНКЖ ингибировать реакцию восстановления дигидрорамина (DHR123) пероксинитритом, образуемым в ходе декомпозиции SIN-1. Были исследованы ДНКЖ, содержащие фосфатные ионы и глутатион в качестве лигандов. ДНКЖ-GS и ДНКЖ-PO₄ – в равной степени тормозили окисление DHR123.

Низкомолекулярные глутатионовые ДНКЖ и связанные с Hb оказывали выраженное ингибирующее действие на окислительную модификацию Hb пероксинитритом. Связанные с 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 (для тетрамера). При концентрации ONOO– 1 мМ (1 : 6,5) карбонильных производных Hb-ДНКЖ образовывалось на 80 % меньше по сравнению с контрольным образцом белка, содержащим свободные SH-группы. Еще более выраженное защитное действие на белок оказывали ДНКЖ-GS. Поскольку раствор ДНКЖ-GS содержит восстановленный глутатион был поставлен эксперимент по влиянию GSH на окислительную модификацию Hb. Защитный эффект GSH при концентрации ONOO– 1 мМ (1 : 6,5 мМ) составлял 30 % по сравнению с контролем. Это указывает на то, что протекторное действие ДНКЖ-GS обусловлено не только входящим в их состав глутатионом. Кривые, отражающие зависимость образования карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии ДНКЖ имели двухфазный характер: при низких концентрациях ONOO– образование карбонильных производных происходило медленно, начиная с концентрации 1,6 мМ – интенсивно. Вероятно, этот эффект связан с высвобождением железа из распавшихся ДНКЖ, которое участвует в генерации свободных радикалов в ходе реакции Фентона.

Как известно, основной мишенью действия ONOO – на гемопротейды является гемовая группа. В наших экспериментах ДНКЖ как связанные с белком, так и низкомолекулярные, препятствовали разрушению гемовой группы. 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 %.

Известно, что разрыву порфиринового кольца предшествует стадия образования оксоферрил-формы гемоглобина ($\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). В образовании оксоферрилHb ключевую роль играет гемовое железо, которое катализирует гомолиз O-O связи в комплексе $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-ONOO-}$ [10]. В наших экспериментах мы наблюдали появление оксоферрил-формы во всех вариантах белка по снижению поглощения при 630 нм и возрастанию при 530 и 560 нм. Стоит отметить, что в оксоферрил-форму переходила только часть гемоглобина и при концентрациях ONOO – более 1 мМ, т. е. в условиях избытка окислителя.

Защитное действие ДНКЖ можно объяснить, исходя из нескольких возможностей. Во-первых, ДНКЖ выступают донорами NO, который может вступать в реакцию с $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ с образованием комплекса $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}$, 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] был предложен аналогичный механизм для взаимодействия ДНКЖ-GS с $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$: $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + (\text{GS-})_2\text{-Fe}^{\pm}(\text{NO}^+)_2 \rightarrow \text{Hb-Fe}^{\text{III}} + (\text{GS-})_2\text{-Fe}^{2\pm}(\text{NO}^+)\text{ONO}$. Интермедиат $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}$ в присутствии низкомолекулярных тиолов вновь восстанавливается в динитрозильные комплексы железа. 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.

Оксоферильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопротейдов [12]. При этом в результате одноэлектронного окисления остатков тирозина формируются феноксильные радикалы. В гемоглобине окислению подвергаются остатки тирозинов Tyr42 и Tyr24. Поэтому было проведено спектрофлуориметрическое исследование тирозиновых остатков под действием пероксинитрита. Судьба тирозинового радикала может быть различной. С одной стороны, в реакции двух тирозиновых радикалов образуется димер 3,3'-дитирозин, который можно детектировать по увеличению интенсивности флуоресценции при 400 нм. В контрольном варианте и в Hb-ДНКЖ флуоресценция возрастала с увеличением концентрации ONOO – Однако начиная с концентрации 1,6 мМ флуоресценция в Hb-ДНКЖ начала снижаться, что может быть связано с образованием 3-нитрозотирозина, который впоследствии трансформируется в 3-нитротирозин.

В экспериментах с GS-ДНКЖ результаты были иные. Флуоресценция возрастала только начиная с 1,6 мМ ONOO – Этот лаг-период в окислении тирозиновых остатков можно объяснить действием примесного глутатиона в образцах GS-ДНКЖ, который является эффективным перехватчиком $\text{NO}_2\cdot$ ($k = 5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [13]. К тому же глутатион может непосредственно восстанавливать пероксинитрит по двухэлектронному механизму и радикалы тирозина.

В Hb помимо тирозинов мишенью атаки ONOO – является триптофан [14]. Поэтому на следующем этапе была изучена зависимость интенсивности испускания флуоресценции триптофана при 327 нм от концентрации ONOO – В контрольном варианте Hb интенсивность флуоресценции линейно уменьшалась, что свидетельствует об окислении / нитровании триптофановых остатков. В остальных вариантах при низких концентрациях окислителя флуоресценция возрастала и только начиная с концентрации 1,6 мМ начиналось уменьшение. Причем в вариантах с GS-ДНКЖ возрастание флуоресценции было более выражено, чем в варианте Hb-ДНКЖ. Этим фактам можно дать следующее объяснение. При определенных концентрациях окислителя белок претерпевает конформационные перестройки, затрагивающие окружение остатка триптофана, что сказывается на флуоресцентных характеристиках белка.

В реакции с пероксинитритом возможно также образование нитротриптофана по двум механизмом с участием пероксиазотистой кислоты и активированного промежуточного продукта ONOOH^* , образующегося из транс-пероксиазотистой кислоты [15]. Эта реакция стимулируется присутствием металлов.

Восстановление феррильного интермедиата в результате реакции с близкорасположенными аминокислотами, такими как тирозин, цистеин или триптофан, 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 денатурирующего SDS электрофореза в 12 % ПААГ в невосстановительных и восстановительных (с дитиотреитолом) условиях. Анализ электрофореграмм показал, что в случае контрольного варианта во всем диапазоне концентраций ONOO⁻ происходило дозозависимое образование димеров Hb и высокомолекулярных агрегатов. При концентрациях ONOO⁻ (2,6 мМ и 4,2 мМ) агрегация была настолько сильной, что белок даже не проникал в концентрирующий гель. В случае, если SH-группы были включены как лиганды в ДНКЖ, агрегация белка происходила только при концентрации ONOO⁻ (2,6 мМ и 4,2 мМ) и в меньшей степени, чем в контрольном образце. В эксперименте с GS-ДНКЖ степень сшивания белка была практически такой же как в Hb-ДНКЖ. Следует отметить, что дитиотреитол не влиял на агрегацию молекул Hb. Это означает, что вклад дисульфидных связей в агрегацию белка незначителен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНКЖ с фосфатными и глутатионовыми лигандами тормозят окисление дигидрородамина пероксинитритом. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами и связанные с гемоглобином эффективно защищают белок от окислительной модификации: препятствуют образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, деградации гемовой группы, а также образованию межбелковых сшивков.

На основе полученных результатов можно сделать Заключение, что ДНКЖ низкомолекулярные и связанные с белком являются акцептором пероксинитрита. Образование связанных с гемоглобином ДНКЖ можно рассматривать как защитную посттрансляционную модификацию, направленную на стабилизацию белковой молекулы в условиях окислительного и нитрозативного стресса.

Полученные результаты согласуются с ранее установленными фактами, демонстрирующими способность ДНКЖ, связанных с Cys-93β гемоглобина, защищать их от окислительной модификации, вызванной гидропероксидами [5, 6]. Мы предполагаем, что действие ДНКЖ антиоксидантное в реакциях окисления и каталитическое в реакции нитрования является сайт-специфическим. Иными словами, эти комплексы защищают и нитруют определенные аминокислотные остатки в белке. Поэтому формирование ДНКЖ на белках можно считать способом регуляции проведения редокс-сигнала в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19-015-00444, №19-29-12052).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsai M. et al.. 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., et al.. 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.
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., et al. 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., et al. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // *Methods in Enzymology.* 2008. 436. 445–461.
7. Шумаев К.Б., et al. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. // *Биохимия.* 2004. 69. 5. 699–705.
8. Shumaev K.B., et al. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019. V. 2019, Article ID 2798154, 12 pages.
9. Pietraforte D., et al. Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3 nitrotyrosine. // *Amino Acids.* 2003. 25. 3–4. 341–350.
10. Romero N., et al. Reaction of Human Hemoglobin with Peroxynitrite. // *J. Biol. Chem.* 2003. 278. 45. 44049–44057.
11. Herold S., et al. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // *Free Rad. Biol. Med.* 2003. 34. 531–545.
12. Vlasova I.I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control. // *Molecules.* 2018. 23. 2561.
13. Ford E., et al. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. // *Free Radic. Biol. Med.* 32. 2002. 1314–1323.
14. 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.
15. Alvarez B., et al. Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. // *Chem Res Toxicol.* 1996. 9. 2. 390–396.