

©Коллектив авторов

## ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

*К.Б. Шумаев<sup>1,2\*</sup>, О.В. Космачевская<sup>1</sup>, Д.И. Грачев<sup>2,3</sup>,  
А.А. Тимошин<sup>2</sup>, А.Ф. Топунов<sup>1</sup>, В.З. Ланкин<sup>2</sup>, Э.К. Рууге<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский пр., 33, стр. 2; \*эл. почта: tomogov@mail.ru

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15а

<sup>3</sup>Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

В различных модельных системах исследовали антиоксидантное действие динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Показано, что ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) эффективно ингибируют индуцированное ионами  $\text{Cu}^{2+}$  перекисное окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Антиоксидантное действие ДНКЖ с фосфатными лигандами и свободного восстановленного глутатиона (GSH) было менее выраженным. Кроме того, GS-ДНКЖ подавляют образование активных форм кислорода при соокислении лецитиновых липосом и глюкозы. Свободнорадикальное окисление в этой системе индуцировали липофильным азоинициатором (AIBN) и оценивали с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. NO резко стимулировал хемилюминесценцию при соокислении глюкозы и липосом, что указывает на образование в этих условиях сильных окислителей. Также установлено, что GS-ДНКЖ перехватывают супероксидный радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), генерируемый в системе ксантин-ксантиноксидаза. Продукцию  $\text{O}_2^{\cdot-}$  оценивали методами люцигенин-зависимой хемилюминесценции и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). С использованием хемилюминесценции показано, что антирадикальное действие GS-ДНКЖ было дозозависимым, причём эти комплексы были более эффективны, чем GSH. Анализ спектров ЭПР аддуктов спиновой ловушки DEPMPO с свободными радикалами позволяет заключить, что при взаимодействии глутатион-содержащих ДНКЖ и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  не образуется тиольного радикала глутатиона. Предложен механизм антиоксидантного действия GS-ДНКЖ, предполагающий образование при их взаимодействии с  $\text{O}_2^{\cdot-}$  или липидными радикалами нестабильных промежуточных комплексов. Далее в результате внутримолекулярной перегруппировки эти интермедиаты распадаются без образования свободнорадикальных продуктов.

**Ключевые слова:** динитрозильные комплексы железа; оксид азота; антиоксидантное действие; свободные радикалы; перекисное окисление; липопротеины низкой плотности

**DOI:** 10.18097/PBMC20216702162

## ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) — это свободный радикал, обладающий уникальными свойствами и участвующий в большом числе нормо- и патофизиологических процессов [1-6]. При всём многообразии функций NO, особый интерес представляет его взаимодействие со свободными радикалами и другими редокс-активными соединениями [1-8]. В этих реакциях участвуют такие метаболиты NO, как динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). В моноядерных ДНКЖ ион железа может быть связан с двумя нитрозильными ( $\text{NO}^+$ ) и двумя тиольными лигандами ( $\text{RS}^-$ ), например глутатионом (общая формула:  $(\text{RS})_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$ ) [3, 4]. В то же время, нейтральный NO входит в состав биядерных ДНКЖ, которые в физиологических условиях находятся в равновесии с моноядерными комплексами. Кроме тиолов, лигандами ДНКЖ могут быть остатки цистеина и гистидина в белках, а также анионы фосфата [3, 7]. Известно, что ДНКЖ играют важную роль в реализации биологической активности NO; в частности, они обладают

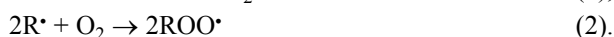
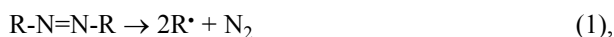
антиоксидантным, цитопротекторным и гипотензивным действием [4, 5, 7-13]. В биологических системах ДНКЖ образуются с участием пула “лабильного” железа, который пополняется за счёт железосодержащих белков [4, 11]. Ранее нами показано, что низкомолекулярные и связанные с белками ДНКЖ реагируют с активными формами кислорода и азота [7-12]. Считается, что благодаря антиоксидантным свойствам глутатион-содержащие ДНКЖ (GS-ДНКЖ) защищают кардиомиоциты в условиях окислительного стресса [13], а эритроциты при галогенирующем стрессе, вызванном гипохлоритом [12]. Вместе с тем, механизмы влияния NO и ДНКЖ на процессы свободнорадикального окисления различных биомолекул и липид-белковых комплексов остаются предметом дискуссии [1, 2, 10-12]. Исходя из вышесказанного, нам представлялось важным исследовать антиоксидантное действие ДНКЖ с различными лигандами в ходе свободнорадикального окисления липосом и липопротеинов низкой плотности (ЛНП), а также в условиях генерирования супероксидного анион-радикала.

## МЕТОДИКА

ДНКЖ синтезировали, как описано в работах [5, 10]. ДНКЖ с фосфатными лигандами получали, пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор  $\text{FeSO}_4$  в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере (pH 6,8). К этим комплексам добавляли восстановленный глутатион (GSH) в молярном соотношении 1:2,25, в результате чего получали GS-ДНКЖ. Препараты ДНКЖ замораживались при температуре жидкого азота ( $-196^\circ\text{C}$ ). Концентрацию ДНКЖ определяли с помощью спектроскопии ЭПР [5]. Препараты ДНКЖ переводили в моноядерную парамагнитную форму, добавляя к ним избыток цистеина (соотношение Fe:тиол — 1:20) и доводя pH раствора до 8,0 [3]. Далее сравнивали интегральную интенсивность сигналов ЭПР моноядерных ДНКЖ и спиновой метки 4-Нидроху-ТЕМРО в известной концентрации.

Липопотеины низкой плотности (ЛНП) выделяли из плазмы венозной крови здоровых доноров, взятой натощак с добавлением ЭДТА (1 мг/мл), в угловом роторе 50Ti на рефрижераторной ультрацентрифуге Beckman L-8 (США) при  $4^\circ\text{C}$  как описано ранее [14, 15]. Полученные ЛНП подвергали диализу в течение 18 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$  против 2000 объёмов 0,145 М NaCl в 50 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,4. Содержание белка в ЛНП определяли по методу Лоури. Окисление ЛНП инициировали при  $37^\circ\text{C}$  добавлением 30 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . Накопление первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — липогиドロпероксидов — регистрировали при 233 нм (максимум поглощения конъюгированных диенов) на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu (Япония) с интегрирующей сферой ISR-2600, позволяющей проводить анализы в мутных средах.

Однослойные липосомы (диаметром  $80 \pm 25$  нм) получали, как описано в работе [15] с помощью микроэкструдера LiposoFast (“Avestin”, Канада). Липосомы формировались из эквимольной смеси яичного фосфатилхолина (лецитина) и липофильного азоинициатора — AIBN (азобисизобутиронитрил). Конечная концентрация фосфатилхолина и AIBN в суспензии липосом составляла 1,4 мМ. ПОЛ инициировали алкильными ( $\text{R}^\bullet$ ) и алкилперекисными радикалами ( $\text{ROO}^\bullet$ ), которые образуются в результате декомпозиции азоинициатора ( $\text{R-N=N-R}$ ) при  $50^\circ\text{C}$  в следующих реакциях:



Кинетику образования свободных радикалов в этих условиях регистрировали с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции [6, 15]. В качестве донора NO применяли PAPA/NONO (3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин).

Для генерирования супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) использовали систему, содержащую 450 мкМ ксантина и 0,1 ед/мл ксантиноксидазы. Кинетику образования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  измеряли с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции [6, 16, 17].

Люминол- и люцигенин-зависимую хемилюминесценцию регистрировали при температуре  $50^\circ\text{C}$  и  $37^\circ\text{C}$ , соответственно, и постоянном перемешивании реакционной смеси на люминометре Lum-5773 (“ИнтерОптика-С”, Россия). Реакционная среда содержала 200 мкМ люминол или 20 мкМ люцигенин, а также 0,1 М K,Na-фосфатный буфер (pH 7,8).

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) применяли для регистрации спектров аддуктов свободных радикалов и спиновой ловушки DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин N-оксида). Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре ( $25^\circ\text{C}$ ) на спектрометре E-109E (“Varian”, США). Образцы (60 мкл) вводили в газопроницаемые капилляры (“Zeus Industrial Products”, США). Далее капилляры помещали в кварцевую трубку, через которую в ходе измерения продували воздух. Условия записи спектров ЭПР аддуктов DEPMPO: СВЧ мощность 10 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0,1 мТл.

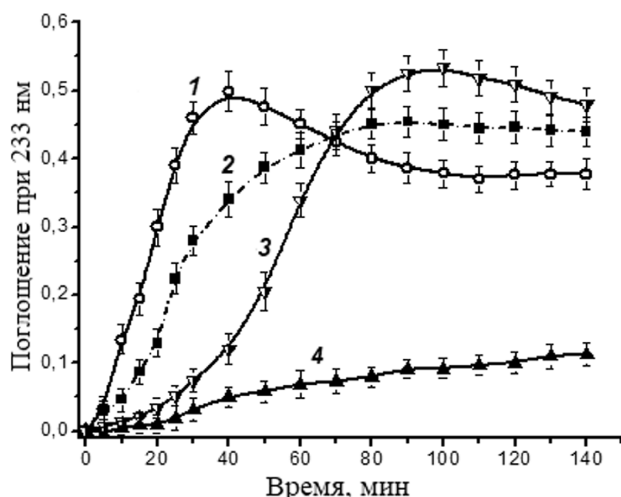
В работе использовали реактивы фирм “Sigma-Aldrich” (США), “Cayman Chemical Europa” (Эстония), “ICN” (США), “Serva” (ФРГ).

Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в трёх-пяти повторях. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10, используя непараметрические методы статистического анализа. Статистически достоверными считали различия между группами при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

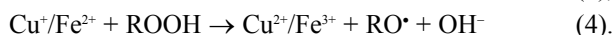
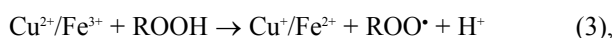
В настоящее время известно, что окислительная модификация липопотеинов низкой плотности (ЛНП) играет важную роль в механизмах патогенеза атеросклероза и сахарного диабета [1, 15, 17-19]. Кроме того, в работах [1, 18] показано, что доноры NO выступают в качестве антиоксидантов при перекисном окислении ненасыщенных липидов ЛНП индуцированном ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , AIBN, либо липоксигеназой. В связи с этим, мы исследовали влияние глутатионовых ДНКЖ на свободнорадикальное окисление липидов ЛНП, вызванное ионами меди (рис. 1).

Из рисунка 1 видно, что в этих условиях действие разных типов ДНКЖ заметно отличается. Установлено, что GS-ДНКЖ в концентрации 20 мкМ существенно подавляют накопление липогиドロпероксидов в ЛНП, причём эти комплексы были намного более эффективны, чем свободный GSH (рис. 1, кривые 1, 2 и 4). Эти данные согласуются с тем, что в сравнении с GSH глутатион-содержащие ДНКЖ более эффективно ингибируют индуцированный гипохлоритом гемолиз эритроцитов [12]. ДНКЖ с фосфатными лигандами вначале ингибировали окисление ЛНП, но позже их антиоксидантное действие снижалось (рис. 1, кривая 3). Более того, через 70 мин инкубации ЛНП с этим вариантом ДНКЖ наблюдалась инверсия антиоксидантного действия в прооксидантное. Данный эффект может быть

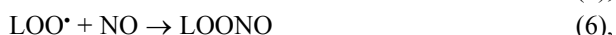


**Рисунок 1.** Влияние ДНКЖ на перекисное окисление липопroteinной низкой плотности (ЛНП). Кривые: (1) — кинетика окисления ЛНП (50 мкг белка/мл) в присутствии 30 мкМ  $\text{CuSO}_4$ ; (2) — то же, что (1) + 45 мкМ глутатиона (GSH); (3) — то же, что (1) + 20 мкМ ДНКЖ с фосфатными лигандами; (4) — то же, что (1) + 20 мкМ GS-ДНКЖ. Инкубация проводилась при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Во всех образцах содержался 50 мМ  $\text{K,Na}$ -фосфатный буфер (pH 7,4).

обусловлен низкой стабильностью содержащих фосфат динитрозильных комплексов железа [3]. Мы полагаем, что ионы железа, высвобождающиеся при распаде ДНКЖ, также, как ионы меди, могут катализировать процессы ПОЛ:



В реакции Фентона (аналогичной реакции 4) ионы  $\text{Fe}^{2+}$  катализуют распад пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) с образованием гидроксильного радикала ( $\text{HO}^\bullet$ ). Предполагают, что ингибирование таких реакций в результате связывания ионов железа в составе ДНКЖ является одним из механизмов антиоксидантного действия NO [4]. Следует отметить, что в ходе разрушения ДНКЖ должен также выделяться свободный NO. Считается, что оксид азота благодаря взаимодействию с алкильными ( $\text{L}^\bullet$ ), алкилперекисными ( $\text{LOO}^\bullet$ ) и алкоксильными радикалами ( $\text{LO}^\bullet$ ) липидов способен обрывать цепные реакции ПОЛ [1, 2, 6-8, 18]:



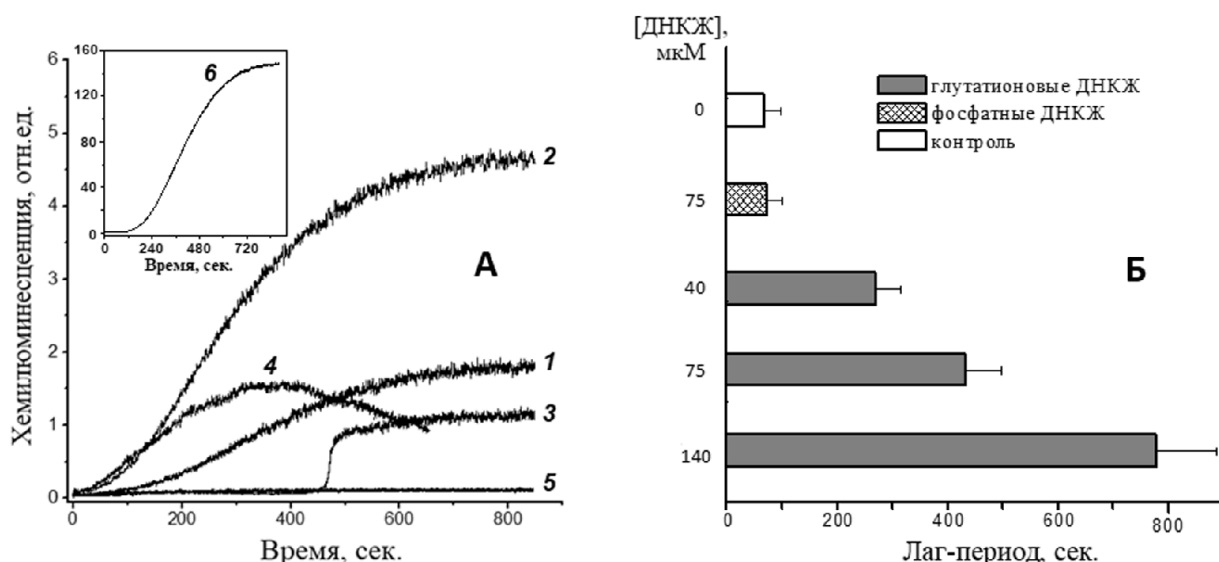
Константы скорости реакций 5-7 равны  $10^9$ - $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [1, 7]. В частности, константа скорости реакции 6 составляет  $\sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , тогда как для реакции  $\text{LOO}^\bullet$  с  $\alpha$ -токоферолом эта константа на три порядка меньше ( $k=2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Вместе с тем, есть данные о кооперативном антиоксидантном действии NO и  $\alpha$ -токоферола, который является основным липофильным антиоксидантом ЛНП [1].

В реакции 6 образуется органический аналог пероксинитрита, который в результате гомолиза распадается на радикалы (реакция 8) или превращается в нитролипиды (реакция 9), с выходом соответственно  $\sim 14\%$  и  $\sim 86\%$  [2]. Биологически активные нитролипиды ( $\text{LNO}_2$ ) образуются также при рекомбинации алкильных радикалов ( $\text{L}^\bullet$ ) и диоксида азота ( $\text{}^\bullet\text{NO}_2$ ). Эффективное антиоксидантное действие тиолсодержащих ДНКЖ в системе с ЛНП согласуется с полученными ранее данными о том, что эти комплексы перехватывают свободные радикалы, образующиеся при распаде гидропероксида *трет*-бутила, ингибируют ПОЛ в гомогенате миокарда крыс, а также соокисление арахидоновой кислоты и  $\beta$ -каротина [8-10].

Известно, что глюкоза стимулирует перекисное окисление в ЛНП и липосомах [15, 20]. В связи с этим антиоксидантное действие ДНКЖ было исследовано в системе, моделирующей процессы ПОЛ при диабетической гипергликемии [15]. Для этого использовали модель соокисления липосом из фосфатидилхолина (лецитина) и глюкозы. Перекисное окисление в данной модели инициировали свободные радикалы, образующиеся при распаде азоинициатора (AIBN) в реакциях 1 и 2. На рисунке 2А представлена кинетика люминол-зависимой хемилюминесценции при совместном окислении глюкозы и липосом из яичного фосфатидилхолина. Видно, что GS-ДНКЖ в этих условиях снижает уровень свободных радикалов, образующихся при соокислении глюкозы с полиненасыщенными липидами и дозозависимо увеличивают продолжительность периода индукции (лаг-периода) свободнорадикального окисления (рис. 2А,Б). ДНКЖ с фосфатными лигандами также уменьшают уровень свободных радикалов, но не влияют на продолжительность периода индукции окисления (рис. 2Б). Известно, что алкилперекисные и алкоксильные радикалы реагируют с сахарами, вызывая их окисление и фрагментацию [15, 17, 19]. В ходе этих процессов, а также связанного с ними неферментативного гликирования белков и аминокислот генерируется супероксид или его протонированная форма (пероксильный радикал,  $\text{HO}_2^\bullet$ ) [15, 17]. На образование  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в наших экспериментах указывает то, что супероксиддисмутаза (СОД) практически полностью ингибирует люминол-зависимую хемилюминесценцию (рис. 2, кривая 5).

По всей видимости, в используемой нами модельной системе ДНКЖ также перехватывают  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , что согласуется с полученными ранее данными [7, 8, 11]. Тем не менее, не исключено, что эти комплексы влияют и на саму продукцию супероксида. Между тем, свободный NO, образующийся при декомпозиции синтетического донора (PAPA/NONO), резко стимулировал хемилюминесценцию (рис. 2А, кривая 6). Такое прооксидантное действие NO, в условиях соокисления глюкозы и липосом, может быть обусловлено образованием пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) в диффузно-контролируемой реакции NO с супероксидом ( $k=1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [21]:

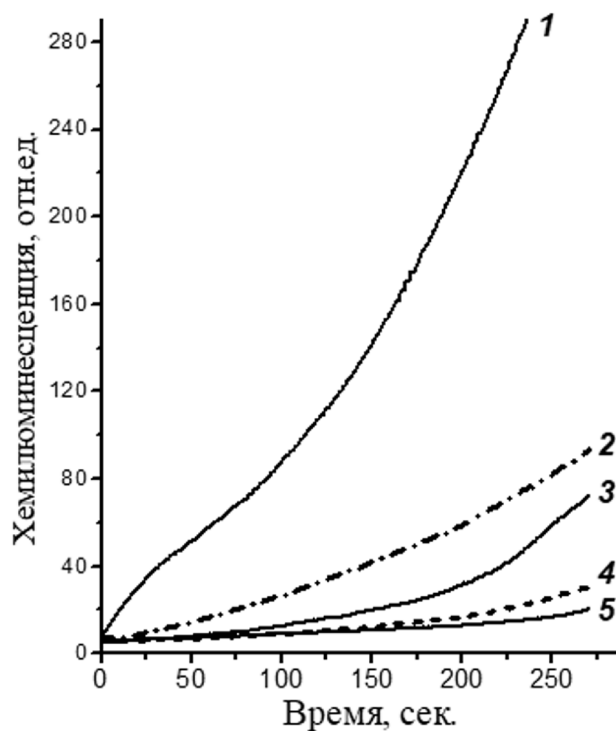




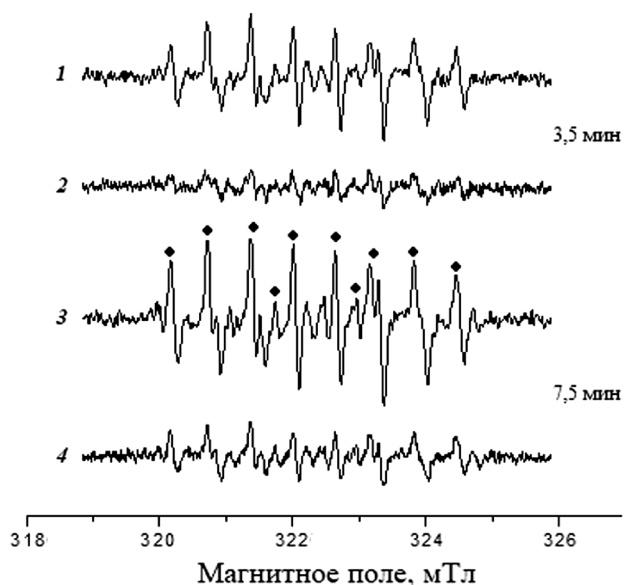
**Рисунок 2.** Влияние ДНКЖ на кинетику люминол-зависимой хемилуминесценции при свободнорадикальном окислении лецитиновых липосом. **А** — кривые: (1) — окисление липосом содержащих лецитин и AIBN; (2) — то же, что и (1) + 12,5 мМ глюкозы (соокисление липосом и глюкозы); (3) — то же, что и (2) + 75 мкМ ДНКЖ с фосфатными лигандами; (4) — то же, что и (2) + 75 мкМ GS-ДНКЖ; (5) — то же, что и (2) + 120 ед/мл СОД. Вставка: кривая (6) — то же, что и (2) + 150 мкМ РАРА/НОНО. **Б** — влияние ДНКЖ на продолжительность лаг-периода соокисления липосом и глюкозы.

В результате протонирования  $\text{ONOO}^-$  распадается с образованием таких сильных окислителей, как  $\text{OH}^\bullet$  и  $^\bullet\text{NO}_2$ . Важно отметить, что процессы, приводящие к повышению продукции  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и пероксинитрита, могут участвовать в механизмах дисфункции эндотелия при диабете [20].

В литературе есть данные, что продукция  $\text{O}_2^{\bullet-}$  с участием митохондрий и ксантиноксидазы усиливается при ишемии и реперфузии ткани [5, 10]. Ранее нами было показано, что ДНКЖ, связанные с гемоглобином или альбумином разрушаются под действием супероксидного радикала [7, 8], а GS-ДНКЖ перехватывают  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , продуцируемый митохондриями из сердца крысы [11]. В последнем случае ДНКЖ снижает уровень семихинона, который образуется в реакции супероксида со спиновой ловушкой TIRON. Тем не менее, семихинон (свободнорадикальная форма) TIRON потенциально может реагировать с самими ДНКЖ или продуктами их распада. Следовательно, механизм взаимодействия ДНКЖ с супероксидом до конца не ясен. Как и в работах [8, 7], мы использовали для генерирования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ферментативную систему ксантин-ксантиноксидаза. Кинетику этого процесса регистрировали с помощью люцигенина, который является более селективным хемилуминесцентным индикатором  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , чем люминол [16]. Из рисунка 3 видно, что GS-ДНКЖ дозозависимо ингибируют люцигенин-зависимую хемилуминесценцию, то есть снижают концентрацию образующегося в этой модельной системе супероксида. Эти ДНКЖ также являются более эффективными, чем свободный GSH (рис. 3, кривые 2 и 4). Исходя из этого, мы полагаем, что обнаруженное в работе [16] снижение люцигенин-зависимой хемилуминесценции в тканях животных под действием NO может быть следствием образования ДНКЖ.



**Рисунок 3.** Влияние глутатионовых ДНКЖ и GSH на кинетику люцигенин-зависимой хемилуминесценции в условиях генерирования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза. Реакционная смесь содержала: 20 мкМ люцигенина, 450 мкМ ксантина, 0,1 ед/мл ксантиноксидазы; (1) — реакционная смесь без добавок; (2) добавление 400 мкМ GSH; (3-5) добавление в смесь соответственно 100 мкМ, 175 мкМ и 350 мкМ глутатионовых ДНКЖ.



**Рисунок 4.** Спектры спиновых аддуктов DEPMPO и свободных радикалов, которые образуются в системе ксантин-ксантиноксидаза. Реакционная смесь содержала: 450 мкМ ксантина, 0,1 ед/мл ксантиноксидазы, 400 ед/мл каталазы, 45 мМ DEPMPO, 250 мкМ ДТРА и 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (pH 7,4). Для исследования влияния GS-ДНКЖ эти комплексы добавляли в среду в концентрации 220 мкМ (спектры 2, 4). Спектры ЭПР регистрировались через 3,5 (1 и 2) и 7,5 мин (3 и 4) после смешивания компонентов. Символом (♦) отмечены линии спектра ЭПР характерные для аддукта DEPMPO с супероксидом (DEPMPO-ООН) [21].

Кроме того, в реакционной среде, содержащей ксантин и ксантиноксидазу, глутатион-содержащие ДНКЖ предотвращают формирование аддукта спиновой ловушки DEPMPO с  $O_2^{\bullet-}$  (рис. 4). Существенно, что DEPMPO образует спиновые аддукты не только с супероксидом [22], но и с другими свободными радикалами, например с  $OH^{\bullet}$  или тиольными радикалами глутатиона ( $GS^{\bullet}$ ) [8, 12, 23]. Поскольку при дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  образуется  $H_2O_2$ , в среду добавляли хелатор железа ДТРА и каталазу, тем самым предотвращая продукцию  $OH^{\bullet}$  в реакции Фентона. Таким образом, с использованием взаимодополняющих методов доказано, что GS-ДНКЖ перехватывают  $O_2^{\bullet-}$ .

Известно, что нитрозильные комплексы меди и марганца реагируют соответственно с  $H_2O_2$  и  $O_2^{\bullet-}$ , в результате чего образуется связанный с этими металлами  $ONOO^-$  [24, 25]. Аналогичные интермедиаты возникают в реакции между молекулярным кислородом и динитрозильными комплексами железа с синтетическими (не тиольными) лигандами [26]. В этих работах показано, что содержащие пероксинитрит комплексы металлов способны нитровать органические молекулы. Вместе с тем, пероксинитрит координированный с ионами переходных металлов может изомеризоваться в нитрат, либо восстанавливаться до нитрита [6, 25].

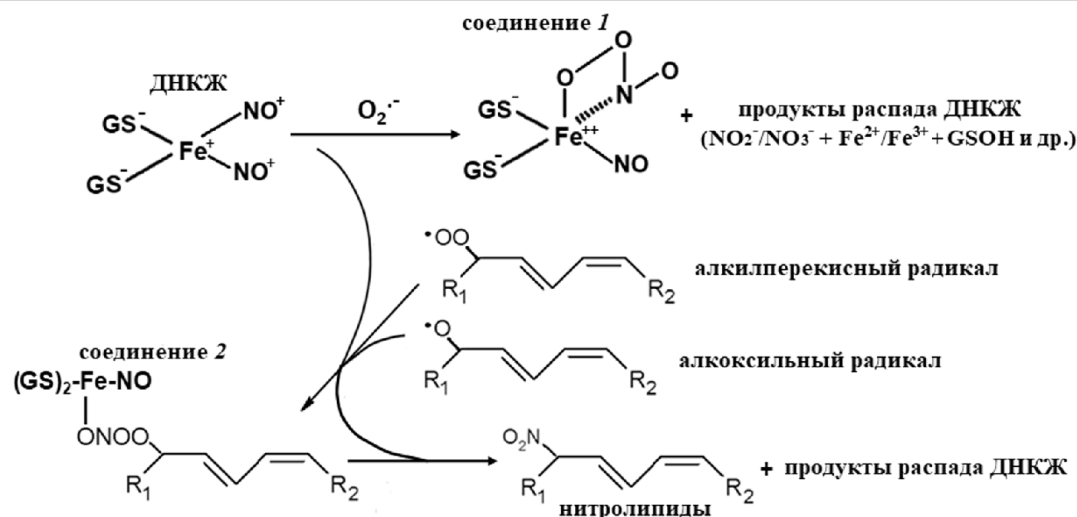
Не исключено, что NO-лиганды ДНКЖ могут взаимодействовать со свободными радикалами ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO_2^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$ ) с образованием таких

интермедиатов, как связанный с железом пероксинитрит или его органический аналог (LOONO). В случае глутатионовых ДНКЖ эти интермедиаты, по-видимому, окисляют тиольные лиганды комплексов. На основании литературных данных и анализа спектров ЭПР можно утверждать (рис. 4) [22, 23], что окисление глутатионового лиганда ДНКЖ происходит по двухэлектронному механизму, поскольку в экспериментах с DEPMPO не обнаружены тиольные радикалы, являющиеся продуктами одноэлектронного окисления глутатиона. Следует отметить, что донорами электронов для внутримолекулярной редокс-реакции могут быть также ионы железа. Действительно, в работе [20] показано, что комплекс GSH с ионами  $Fe^{2+}$  реагирует с пероксинитритом намного более эффективно, чем свободный глутатион, причём  $ONOO^-$  восстанавливается до нитрита, а GSH окисляется до сульфеновой кислоты (GSOH). В используемых нами модельных системах антиоксидантное действие GSH и ДНКЖ с фосфатными лигандами также было меньшим, чем у GS-ДНКЖ, а свободный NO мог проявлять прооксидантные свойства. Можно предположить, что GS-ДНКЖ в условиях окислительного стресса реагируют с супероксидом и свободными радикалами липидов в соответствии с механизмом представленным на рисунке 5.

Согласно этому механизму, высокая антиоксидантная активность глутатионовых ДНКЖ связана с синергичным действием всех компонентов этих комплексов. Вместе с тем, этот механизм позволяет хорошо объяснить кардиопротекторные свойства ДНКЖ при усилении продукции активных форм кислорода в ходе ишемии-реперфузии [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В различных системах, моделирующих окислительный стресс, показано, что ДНКЖ с глутатионовыми лигандами ингибируют свободнорадикальное перекисное окисление липидов, а также перехватывают супероксидный радикал. Антиоксидантные свойства этих ДНКЖ, по всей видимости, определяются "кооперативным" действием входящих в них тиольных и NO-лигандов. Общим механизмом при взаимодействии ДНКЖ с супероксидом и алкилперекисными радикалами липидов может быть формирование нестабильных интермедиатов, при разрушении которых не образуются сильные окислители. Напротив, в аналогичных реакциях свободного NO продуцируется пероксинитрит и его органический аналог, при гомолизе которых вновь образуются свободные радикалы. Исходя из этого мы полагаем, что ДНКЖ являются триггерами во многом определяющими антиоксидантный или прооксидантный характер действия NO в биологических системах. Таким образом, проведенные нами исследования позволяют обосновать механизм антиоксидантного действия NO-содержащих комплексов железа, а также их использование в качестве перспективных фармакологических средств.



**Рисунок 5.** Возможный механизм взаимодействия GS-ДНКЖ с супероксидом, алкилперекисными и алкоксильными радикалами липидов. В реакциях NO-лигандов с  $O_2^{\cdot-}$  образуется пероксинитрит координированный с железом комплекса (соединение 1). В аналогичной реакции с алкилперекисным радикалом образуется органический аналог пероксинитрита (соединение 2). Далее в результате внутримолекулярной редокс-реакции глутатионовые лиганды окисляются до сульфеновой кислоты (GSOH), а соединения 1 и 2 распадаются без образования свободнорадикальных интермедиатов. Представляется вероятным, что при распаде соединения 2, а также в результате реакций ДНКЖ с алкоксильными радикалами могут возникать нитролипиды.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Гречниковой, И.С. Пугаченко и канд. биол. наук Г.Г. Коноваловой за помощь в проведении некоторых экспериментов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта № 19-015-00444 Российского фонда фундаментальных исследований.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено Комитетом по этике Национального медицинского исследовательского центра кардиологии (Протоколы №177 от 7 сентября 2012 г. и №221 от 28 ноября 2016 г.). Доноры крови, использовавшейся для получения ЛНП, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В остальных экспериментах не применялись биоматериалы, полученные от людей и животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rubbo H., O'Donnell V. (2005) Toxicology, **208**, 305-317.
2. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L., Davies K.J.A. (2006) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., **291**, R491-R511. DOI: 10.1152/ajpregu.00614.2005.
3. van Faassen E., Vanin A.F. (eds.) (2007) Radicals For Life: The Various Forms of Nitric Oxide. Elsevier, Amsterdam.
4. Li Q., Li C., Mahtani H.K., Du J., Patel A.R., Lancaster Jr. J.R. (2014) J. Biol. Chem., **289**(29), 19917-19927.
5. Vanin A.F. (2016) Nitric Oxide, **54**, 15-29.
6. Radi R. (2018) Proc. Natl. Acad., **115**(23), 5839-5848.
7. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. (2008) Nitric Oxide, **18**(1), 37-46.
8. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. (2008) Methods Enzymol., **436**, 445-461.
9. Шумаев К.Б., Рууге Э.К., Ланкин В.З., Ванин А.Ф., Гомбоева С.Б., Беленков Ю.Н. (2001) Докл. РАН, **379**(5), 702-704. [Shumaev K.B., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Vanin A.F., Gomboeva S.A., Belenkov Y.N. (2001) Dokl. Biochem. Biophys., **379**(5), 273-275.]
10. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленикова Е.И., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. (2007) Биофизика, **52**(3), 503-508. [Gudkov L.L., Shumaev K.B., Kalenikova E.I., Gubkina S.A., Vanin A.F., Ruuge E.K. (2007) Biophysics, **52**(3), 315-321.]
11. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. (2018) BioFactors, **44**(3), 237-244.
12. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigorieva D.V., Panasenkov O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. (2019) Oxidative Medicine Cellular Longevity, **2019**, Article ID 2798154, 12 pages. DOI: 10.1155/2019/2798154.
13. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. (2019) Pflugers Arch., **471**(4), 583-593.
14. Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., Orekhov A.N. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., **214**, 608-613.
15. Lankin V., Konovalova G., Tikhaze A., Shumaev K., Kumsikova E., Viigimaa M. (2014) Mol. Cell Biochem., **395**(1-2), 241-252.
16. Matveeva N.S., Lyubitsky O.B., Osipov A.N., Vladimirov Yu.A. (2007) Biophysics, **52**(6), 632-639.
17. Lankin V.Z., Shadyro O.I., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Sladkova A.A. (2019) J. Antioxidant Activity, **1**(4), 33-45.

18. Hogg N., Kalyanaraman B., Joseph J., Struck A., Parthasarathy S. (1993) FEBS Lett., **334**(2), 170-174.
19. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. (2017) Curr. Aging Sci., **10**(1), 18-25.
20. Zou M.-H., Cohen R., Ullrich V. (2004) Endothelium, **11**(2), 89-97.
21. Damasceno F.C., Condeles A.L., Lopes A.K.B., Facci R.R., Linares E., Truzzi D.R., Augusto O., Toledo Jr. J.C. (2018) J. Biol. Chem., **293**, 8530-8542.
22. Dikalov S., Jiang J., Mason R.P. (2005) Free Radical Res., **39**(8), 825-836.
23. Karoui H., Hogg N., Fréjaville C., Tordo P., Kalyanaraman B. (1996) J. Biol. Chem., **271**(11), 6000-6009.
24. Mondal B., Borah D., Mazumdar R., Biplab M. (2019) Inorg. Chem., **58**(2), 1234-1240.
25. Kalita A., Kumar P., Mondal B. (2013) Inorg. Chem., **52**(19), 10897-10903.
26. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënne-Loccoz P., Callan P.E., Shearer J., Kirschenbaum L.J., Kim E. (2011) J. Am. Chem. Soc., **133**(5), 1184-1187.

Поступила в редакцию: 07. 03. 2021.  
После доработки: 24. 03. 2021.  
Принята к печати: 01. 04. 2021.

## POSSIBLE MECHANISM OF ANTIOXIDANT ACTION OF DINITROSYL IRON COMPLEXES

**K.B. Shumaev<sup>1,2\*</sup>, O.V. Kosmachevskaya<sup>1</sup>, D.I. Grachev<sup>2,3</sup>,  
A.A. Timoshin<sup>2</sup>, A.F. Topunov<sup>1</sup>, V.Z. Lankin<sup>2</sup>, E.K. Ruuge<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Bach Institute of Biochemistry, 33/2 Leninsky ave., Moscow, 119071 Russia; \*e-mail: tomorov@mail.ru

<sup>2</sup>National Medical Research Centre for Cardiology, 15a, 3-rd Cherepkovskaya, Moscow, 121552 Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119234 Russia

The antioxidant effect of dinitrosyl iron complexes (DNICs) was studied in various model systems. DNICs with glutathione ligands effectively inhibited Cu<sup>2+</sup>-induced peroxidation of low density lipoproteins (LDL). The antioxidant effect of DNICs with phosphate ligands and free reduced glutathione (GSH) was less pronounced. In addition, DNICs with glutathione suppressed the formation of reactive oxygen species during co-oxidation of lecithin liposomes and glucose. Free radical oxidation in this system was induced with a lipophilic azo initiator and evaluated by luminol-dependent chemiluminescence. NO sharply stimulated chemiluminescence during co-oxidation of glucose and liposomes, thus suggesting the formation of potent oxidants under these conditions. Glutathione DNICs scavenge the superoxide radical anion generated in the xanthine-xanthine oxidase system. Superoxide production was assessed by lucigenin-dependent chemiluminescence and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Chemiluminescence revealed the dose-dependent character of antiradical effect of glutathione DNICs; moreover, these complexes turned out to be more efficient than GSH. EPR spectra of the adducts of the DEPMPO spin trap with free radicals suggest that the interaction of glutathione DNICs and superoxide does not result in the formation of the thiyl radical of glutathione. Here we propose a mechanism of the antioxidant action of glutathione DNICs, suggesting that unstable intermediate complexes are formed upon their interaction with superoxide or lipid radicals. Further, as a result of intramolecular rearrangement, these intermediates decompose without the free radical as the by-products.

**Key words:** dinitrosyl iron complexes; nitric oxide; antioxidant effect; free radicals; peroxidation; low density lipoproteins

**Funding.** This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 19-015-00444).

Received: 07.03.2021, revised: 24.03.2021, accepted: 01.04.2021.