

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ГЛИКИРОВАНИЕ БИМОЛЕКУЛ

Шумаев К.Б.<sup>1,2</sup>, Космачевская О.В.<sup>1</sup>, Топунов А.Ф.<sup>1</sup>, Насыбуллина Э.И.<sup>1</sup>,  
Мартусевич А.К.<sup>4</sup>, Рууге Э.К.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»  
Ленинский пр., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: tomorov@mail.ru

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России,  
3-я Черепковская ул., 15а, г. Москва, 121552, РФ

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1/2, г. Москва, 119991, РФ

<sup>4</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России  
пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603005, РФ

Поступила в редакцию: 16.07.2021

**Аннотация.** Процессы модификации биомолекул при окислительном и карбонильном стрессе взаимосвязаны и во многом определяются генерацией свободных радикалов. Активные карбонильные соединения, например, метилглиоксаль реагируют с аминокетонами белков и аминокислот с образованием оснований Шиффа, в том числе диалкилиминов. Эти реакции являются первой стадией неферментативного гликирования, в ходе которого также возникают свободнорадикальные интермедиаты. Вместе с тем известно, что оксид азота взаимодействует с конечными продуктами гликирования. Нами установлено, что доноры оксида азота (РАРА/NO, S-нитрозотиолы) усиливают продукцию органических свободных радикалов в реакции неферментативного гликирования L-лизина и N $\alpha$ -ацетиллизина под действием метилглиоксаля. Напротив, такие метаболиты оксида азота (NO) как глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа и нитроксил снижают уровень этих радикалов. Выдвинуто предположение, что эффект оксида азота и S-нитрозотиолов связан с образованием редокс-активных соединений, которые в свою очередь являются медиаторами продукции свободных радикалов. С другой стороны, нитроксил и динитрозильные комплексы железа выступают в качестве антиоксидантов и антигликирующих агентов. Мы полагаем, что двойственное действие NO и его физиологических производных играет важную роль при модификации биомолекул в ходе диабетической гипергликемии.

**Ключевые слова:** неферментативное гликирование, метилглиоксаль, свободные радикалы, оксид азота, S-нитрозотиолы, спектроскопия ЭПР.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что неферментативное гликирование биомолекул приводит к их модификации и инактивации [1-6]. У человека эти процессы лежат в основе карбонильного стресса и наблюдаются в условиях диабетической гипергликемии. Следует также отметить, что при карбонильном стрессе накапливаются активные карбонильные соединения, в частности продукт метаболизма глюкозы альфа-кетоальдегид метилглиоксаль. Ранее было показано, что в ходе неферментативного гликирования в реакциях аминокетонами или белков с метилглиоксалем образуются различные свободные радикалы [1,3]. Показано, что при взаимодействии метилглиоксаля с аминокетонами аминокетонами и белков образуются основания Шиффа, в том числе диалкилимины. В результате одноэлектронного окисления диалкилимина метилглиоксалем образуется анион радикал последнего и катион-радикал основания Шиффа:



В присутствии кислорода метилглиоксаль $^{\bullet-}$  окисляется с образованием супероксидного анион-радикала [1,3]. Считается также, что дисфункция эндотелия при карбонильном стрессе связана с изменением уровня оксида азота (NO) [7,8]. В культуре клеток гладких мышц аорты метилглиоксаль стимулирует образование оксида азота индуцибельной NO-синтазой [7]. Кроме того, в этих условиях возрастает концентрация супероксидного радикала, при взаимодействии которого с NO формируется такой сильный окислитель как пероксинитрит. Вместе с тем, ассоциированная с сахарным диабетом артериальная гипертензия может быть следствием как вызванного метилглиоксалем окислительного стресса, так и ингибирования этим активным карбонильным соединением фосфорилирования эндотелиальной NO-синтазы [8]. С другой стороны, в литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования биологически важных молекул [2,4,5]. Так показано, что различные доноры NO ингибируют образование продуктов конечного гликирования (пентозидинов) [2]. Ранее нами было выяснено, что при неферментативном гликировании гемоглобина метилглиоксалем S-нитрозоглутатион участвует в модификации гемовой группы [5]. Из сказанного выше

следует, что существуют различные механизмы взаимного влияния NO и метилглиоксала при карбонильном стрессе, однако далеко не все они изучены.

В данной работе исследовали влияние метаболитов NO (S-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, нитроксил) и синтетического донора оксида азота (PAPA/NONO) на формирование органических свободных радикалов при неферментативном гликировании.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

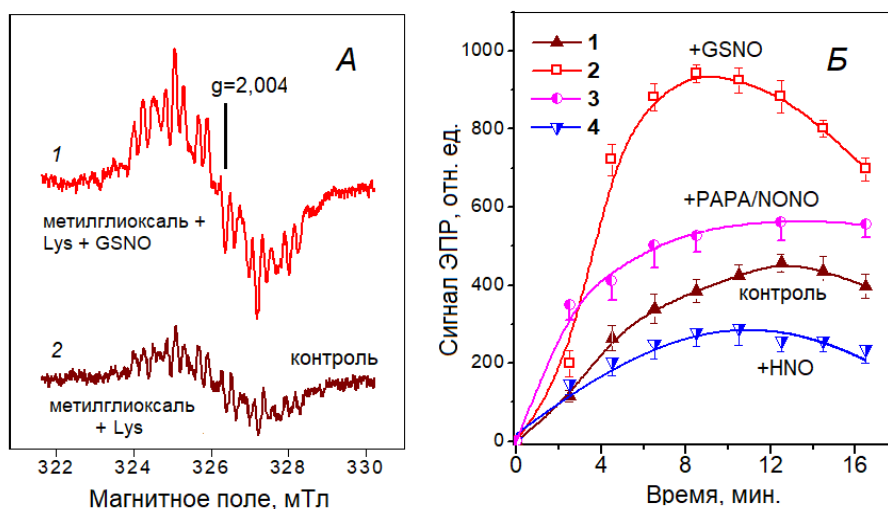
В работе использовали метилглиоксаль, L-лизин, N $\alpha$ -ацетиллизин и восстановленный глутатион (GSH) производства фирмы «Sigma» США. PAPA/NONO (3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин) и соль Ангели были получены от фирмы «Cauman Chemical Europa» Эстония.

S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) синтезировались как описано в работах [4,5]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами получали, смешивая растворы FeSO<sub>4</sub> и GSH в молярном соотношении 1:2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO. S-Нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозоцистеин получали, смешивая эквимольные концентрации NaNO<sub>2</sub> и тиолов в кислой среде. Синтезированные препараты ДНКЖ и S-нитрозотиолов хранили при температуре жидкого азота (-196°C). Спектры поглощения GSNO и S-нитрозоцистеина записывали на спектрофотометре Beckman Coulter  $\Delta$  650 (США). Концентрацию S-нитрозотиолов определяли по величине оптического поглощения при 335 нм ( $\epsilon_{335} = 920 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

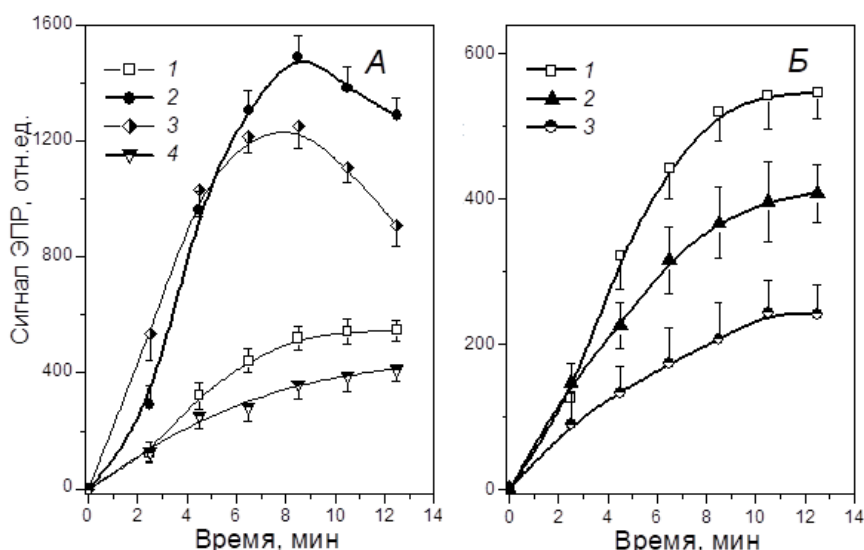
Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (~25°C) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США). Условия регистрации: СВЧ мощность 20 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,2 мТл. Запись спектров начинали через 1 мин после смешивания реакционных компонентов. Реакционную смесь (120 мкл) вводили в газопроницаемые тефлоновые капилляры PTFE 22 («Zeus Industrial Products», США). Капилляры помещали в кварцевую трубку, через которую в ходе измерения постоянно продували азот. Это позволяло поддерживать в реакционной среде условия гипоксии и регистрировать органические свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии аминокислот и метилглиоксала. Статистический анализ результатов проводился с использованием t-критерия и теста ANOVA при помощи программы Origin 8. Различия между экспериментальными данными считались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для моделирования неферментативного гликирования при карбонильном стрессе использовали реакцию метилглиоксала с L-лизином и N $\alpha$ -ацетиллизином. Последний использовался как аналог остатка лизина в белках. При продувке реакционной среды азотом с помощью спектроскопии ЭПР обнаружено образование анион-радикала метилглиоксала и катион-радикала диалкилимина (основания Шиффа) (рис. 1А). Установлено, что продукцию этих свободных радикалов существенно стимулирует PAPA/NONO и такие физиологические доноры оксида азота как S-нитрозоцистеин и S-нитрозоглутатион, причём последние были более эффективны (рис. 1 и 2).



**Рисунок 1.** Влияние доноров и метаболитов NO на образование органических свободных радикалов в реакции L-лизина с метилглиоксалем. А: (1) – спектры ЭПР зарегистрированные в реакционной среде содержащей 100 мМ L-лизина, 100 мМ метилглиоксала в 0,2 М К<sub>2</sub>Na-фосфатном буфере, pH 8,5; (2) – (1) + 4 мМ S-нитрозоглутатиона (GSNO). Спектры регистрировались после 6,5 мин инкубации при продувке азотом. Б: Кинетики образования свободных радикалов. (1) – контроль; (2) – (1) + 4 мМ GSNO; (3) – (1) + 4,8 мМ PAPA/NONO; (4) – (1) + 4 мМ соли Ангели (донор HNO)



**Рисунок 2.** Влияние S-нитрозотиолов и GS-ДНКЖ (А), HNO и GSH (Б) на кинетику образования анион-радикала метилглиоксала и катион радикала диалкилимина в реакции N $\alpha$ -ацетиллизина и метилглиоксала. Панель А - состав среды: 160 мМ N $\alpha$ -ацетиллизина, 160 мМ метилглиоксала, 1 мМ ДТПА, а также 4 мМ GS-NO (2) или 4 мМ S-нитрозоцистеина (3) или 1 мМ GS-ДНКЖ. Состав среды (Б) тот же, что и (А), но вместо S-нитрозотиолов добавлены 4 мМ соли Ангели (2) или 4 мМ восстановленного глутатиона (3). Кривые (1) на обеих панелях отражают кинетику образования свободнорадикальных интермедиатов без добавок

В то же время, продукт одноэлектронного восстановления NO - нитроксил (HNO) снижал уровень свободнорадикальных интермедиатов неферментативного гликирования (рис. 1Б, кривая 4 и рис. 2Б, кривая 2). Аналогичный эффект наблюдался при введении в реакционную среду содержащих глутатион динитрозильных комплексов железа (GS-ДНКЖ) (рис. 2А, кривая 4).

Нельзя исключить, что в свободнорадикальных реакциях, возникающих в ходе неферментативного гликирования участвуют ионы примесного железа. Тем не менее, добавление в реакционную среду хелатора железа ДТПА (диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) практически не влияло на наблюдаемые эффекты.

Вместе с тем, продукт одноэлектронного восстановления NO - нитроксил (HNO) снижал уровень свободнорадикальных интермедиатов неферментативного гликирования (рис. 1Б, кривая 4 и рис. 2Б, кривая 2). Аналогичный эффект наблюдался при введении в реакционную среду содержащих глутатион динитрозильных комплексов железа (GS-ДНКЖ) (рис. 2А, кривая 4).

Нельзя исключить, что в свободнорадикальных реакциях, возникающих в ходе неферментативного гликирования участвуют ионы примесного железа. Тем не менее, добавление в реакционную среду хелатора железа ДТПА (диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) практически не влияло на наблюдаемые эффекты.

Продукция свободнорадикальных интермедиатов может стимулироваться как S-нитрозотиолами (RSNO), так и образующимся при их декомпозиции NO. Действительно, в реакционной среде содержащей метилглиоксаль и L-лизин происходит быстрое разрушение S-нитрозоглутатиона. Декомпозиция RSNO может проходить в следующих реакциях:



Мы полагаем, что медиатором одноэлектронного окисления диалкилимина метилглиоксалем (реакции 1) являются редокс-активные производные S-нитрозотиолов и NO. В качестве таких медиаторов могут функционировать анион-радикалы  $\text{RSNO}^{\cdot-}$  и соединения, возникающие в результате нитрозилирования продуктов реакции неферментативного гликирования. В отличие от S-нитрозотиолов, которые в реакции 2 является окислителем, нитроксил, по-видимому, выступает в качестве восстановителя свободных радикалов. GS-ДНКЖ также могут восстанавливать свободные радикалы, образующиеся в реакции 1, поскольку в их состав входит глутатион. Лигандами GS-ДНКЖ является восстановленный глутатион (GSH) в анионной форме {формула этих комплексов:  $(\text{GS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$ }. Кроме того, GSH реагирует с метилглиоксалем с образованием тиогемацетала. Так ранее нами было показано, что тиол-содержащие ДНКЖ могут модифицироваться метилглиоксалем [4]. Действительно, в наших экспериментах GSH снижает уровень регистрируемых свободных радикалов (рис 2Б, кривая 3). По всей видимости, в условиях карбонильного стресса ДНКЖ и нитроксил действуют как антиоксиданты и антигликирующие агенты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, свободный NO и его метаболиты могут оказывать разнонаправленное действие на образование органических свободных радикалов в реакции метилглиоксалия с аминокислотами. Эти данные согласуются с тем, что NO обладает дихотомическим действием при окислительном и карбонильном стрессе. Такой «Янус эффект» оксида азота, вероятно, определяется различными редокс-свойствами физиологических производных NO и может играть важную роль при развитии патологических процессов, связанных с диабетом.

*Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 19-015-00444.*

**Список литературы/References:**

1. Lee C., Yim M.B., Chock P. B., Yim H.S., Kang S.O. Oxidation-Reduction Properties of Methylglyoxal-modified Protein in Relation to Free Radical Generation. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 39, pp. 25272-25278. doi: 10.1074/jbc.273.39.25272
2. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. *Kidney Int.*, 2000, vol. 58, no. 4, pp. 1780-1787. doi: 10.1111/j.1523-1755.2000.00340.x
3. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями. *Биохимия*, 2009, т. 74, № 4, с. 568-574. [Shumaev K.B., Gubkina S.A., Kumsikova E.M., Shepelkova G.S., Ruuge E. K., Lankin V.Z. Superoxide Formation as a Result of Interaction of L-Lysine with Dicarboxyl Compounds and Its Possible Mechanism. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, vol. 74, no. 4, pp. 461-466. (In Russ.)]
4. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Образование нового типа динитрозильных комплексов железа, связанных с цистеином, модифицированным метилглиоксалем. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 2, с. 239-245. [Shumaev K.B., Gubkina S.A., Vanin A.F., Burbaev D.Sh., Mokh V.P., Topunov A.F., Ruuge E.K. Formation of a new type of dinitrosyl iron complexes bound to cysteine modified with methylglyoxal. *Biofizika*, 2013, vol. 58, no 2, pp. 239-245. (In Russ.)]
5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of Nitri- and Nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 2014, vol. 52, no. 1, pp. 161-168. doi: 10.1515/ccm-2012-0792
6. Ланкин В.З., Шумаев К.Б., Тихазе А.К., Курганов Б.И. Влияние дикарбониллов на кинетические характеристики глутатионпероксидазы. *Доклады академии наук*, 2017, т. 475, № 6, с. 706-709. doi: 10.7868/S0869565217240227 [Lankin V.Z., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Kurganov B.I. Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 475, no. 1, pp. 287-290. doi: 10.1134/S1607672917040123 (In Russ.)]
7. Chang T., Wang R., Wu L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 2005, vol. 38, no. 2, pp. 286-293. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.034
8. Turkseven S., Ertuna E., Yetik-Anacak G., Yasa M. Methylglyoxal causes endothelial dysfunction: the role of endothelial nitric oxide synthase and AMP-activated protein kinase  $\alpha$ . *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 109-115. DOI: 10.1515/jbcpp-2013-0095

## INFLUENCE OF VARIOUS NITRIC OXIDE DONORS ON NON-ENZYMATIC GLYCATION OF BIOMOLECULES

Shumaev K.B.<sup>1,2</sup>, Kosmachevskaya O.V.<sup>1</sup>, Topunov A.F.<sup>1</sup>, Nasybullina E.I.<sup>1</sup>, Martusevich A.K.<sup>4</sup>, Ruuge E.K.<sup>2,3</sup><sup>1</sup> Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences»*Leninsky prospect, 33, build. 2, Moscow, 19071, Russia; e-mail: tomorov@mail.ru*<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russian Federation,*3-ya Cherepkovskaya str., 15a, Moscow, 121552, Russia*<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University*Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991, Russia*<sup>4</sup> Privolzhsky Research Medical University*Nizhny Novgorod, 603005, Russia*

**Abstract.** It is known that the modification of biomolecules under conditions of oxidative and carbonyl stress is associated with the generation of free radicals. Active carbonyl compounds, for example, methylglyoxal react with amino groups of proteins and amino acids to form Schiff bases, including dialkylimines. During these reactions of non-enzymatic glycation, free radical intermediates are also formed. At the same time, it is known that nitric oxide (NO) interacts with the advanced glycation end-products. Our study reveals that donors of nitric oxide (PAPA/NONO, S-nitrosothiols) stimulate the production of organic free radicals in the reaction of non-enzymatic glycation of amino acids under methylglyoxal. In contrast, NO metabolites such as glutathione-containing dinitrosyl iron complexes and nitroxyl (HNO) reduce the level of these radicals. It is suggested that the effect of nitric oxide and S-nitrosothiols is associated with the formation of redox-active compounds, which in turn are mediators of free radical production. On the other hand, HNO and dinitrosyl iron complexes act as antioxidants and antiglycating agents. We believe that the dual action of NO and its derivatives plays a critical role in modifying biomolecules during diabetic mellitus.

**Key words:** *non-enzymatic glycation, methylglyoxal, free radicals, nitric oxide, S-nitrosothiols, EPR spectroscopy.*