

**НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА.
АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ**
Шумаев К.Б.^{1,2}, Космачевская О.В.¹, Топунов А.Ф.¹, Грачев Д.И.^{2,3}, Насыбуллина Э.И.¹,
Пугаченко И.С.¹, Рууге Э.К.^{2,3}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Ленинский просп., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова Минздрава России
ул. 3-я Черепковская, 15а, г. Москва, 121552, РФ

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: tomorov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0572

Аннотация. Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются важными метаболитами оксида азота (NO), обладающими широким спектром биологической активности. Свойства этих комплексов определяют не только NO-лиганды, но и другие компоненты, входящие в их состав. С помощью спектроскопии ЭПР было показано, что железо в ДНКЖ может быть связано с карнозином, L-эрготионеином и аденозиндифосфатом (АДФ). Установлено, что наиболее эффективно новые варианты динитрозильных комплексов железа образуются с участием нитроксильного аниона, который является продуктом одноэлектронного восстановления NO. В модельных системах показано, что ДНКЖ связанные с карнозином и эрготионеином снижают уровень различных свободных радикалов. В частности, эти варианты ДНКЖ перехватывают супероксидный анион-радикал, который является предшественником других активных форм кислорода и азота. Вместе с тем, ДНКЖ связанные с карнозином уменьшают концентрацию органических свободных радикалов в системе содержащей нитроксильный анион, ионы железа и гидропероксид трет-бутила. С другой стороны, ДНКЖ связанные с эрготионеином и АДФ могут играть важную роль в защите митохондрий. Можно предположить, что новые варианты ДНКЖ являются компонентами антиоксидантных систем, локализованных в различных тканях организма. Также, они могут функционировать в качестве редокс-зависимых переключателей, регулирующих ответ клетки на окислительный стресс.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, свободные радикалы, спектроскопия ЭПР.

Считается, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются важными физиологическими производными оксида (NO) [1,2]. В настоящее время наиболее хорошо изучены ДНКЖ лигандами которых наряду с NO являются низкомолекулярные или связанные с белками тиолы. Известно, что эти ДНКЖ обладают широким спектром биологической активности, в том числе они способны функционировать в качестве переносчиков и доноров NO, а также эффективных антиоксидантов [3-6]. Вместе с тем, железо в динитрозильных комплексах может быть координировано с фосфатными анионами, азотом имидазольного кольца гистидина и другими молекулами [1-3,5].

В нашей работе с использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было показано, что лигандами ДНКЖ может быть карнозин (бета-аланил-L-гистидин), L-эрготионеин и АДФ. Нужно отметить, что в отличие от известных тиол-содержащих динитрозильных комплексов железа в формировании новых вариантов парамагнитных ДНКЖ может участвовать нитроксильный анион (NO⁻), который является продуктом одноэлектронного восстановления NO [7]. Роль карнозина и L-эрготионенина в биологических системах до конца не ясна. Тем не менее, эти соединения накапливаются в некоторых тканях в миллимолярных концентрациях и перехватывают активные формы кислорода (АФК). Предполагают, что они защищают клетки от окислительного стресса, развивающегося в ходе многих патофизиологических процессов [8,9]. Известно, что ДНКЖ с тиольными лигандами перехватывают супероксидный анион-радикал и другие свободные радикалы с чем связывают их антиоксидантные свойства.

На рисунке 1 представлена кинетика образования связанных с карнозином ДНКЖ в реакционной среде, содержащей этот дипептид, ионы железа и донор NO⁻ - соль Анджели. Видно, что после добавления в среду ферментативной системы генерации супероксидного анион-радикала (ксантин+ксантинооксидаза) происходит падение уровня карнозиновых ДНКЖ, но достаточно быстро уровень этого парамагнитного комплекса снова начинает увеличиваться. Следует отметить, что в реакциях NO⁻ с молекулярным кислородом или NO с супероксидом (O₂^{•-}) образуется такой сильный окислитель как пероксинитрит (ONOO⁻):



Действительно, ранее нами было показано, что ДНКЖ связанные с гемоглобином эффективно утилизируют ONOO⁻ [6]. По всей видимости, карнозиновые ДНКЖ также способны нейтрализовать этот окислитель.

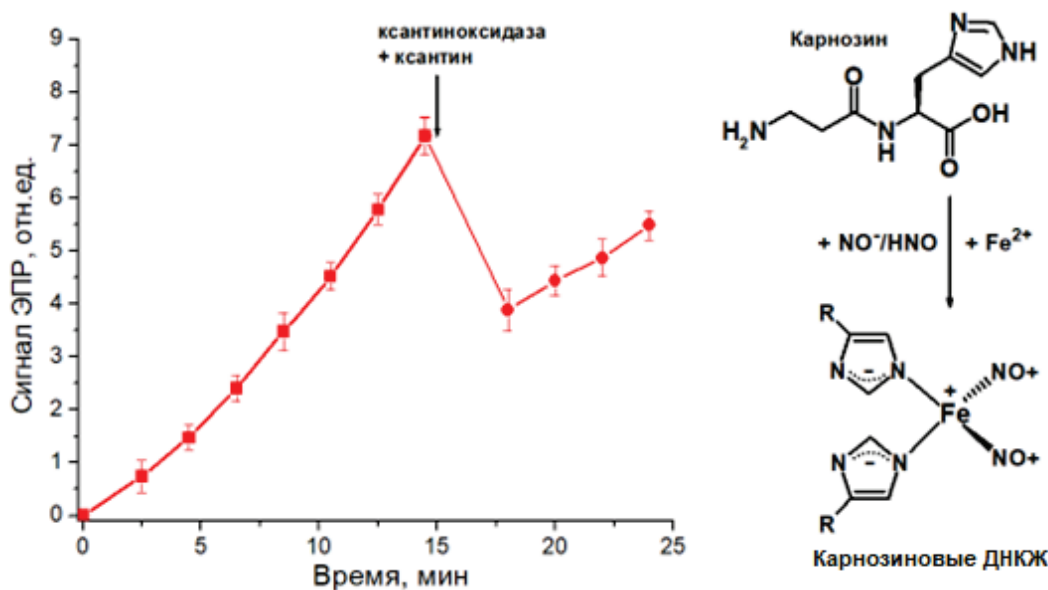


Рисунок 1. Кинетика образования ДНКЖ с карнозиновыми лигандами. Реакционная среда содержала 75 мМ карнозина, 1 мМ FeSO₄, 5 мМ соли Анджели и 120 мМ Нерес буфер (pH 7,6). На рисунке также приведена схема формирования карнозиновых ДНКЖ. Спектры ЭПР снимались при комнатной температуре и азрации образцов (образцы помещались в газопроницаемые капилляры и далее кварцевую трубку в резонаторе ЭПР-спектрометра через которую продували воздух)

Предполагают, что механизм утилизации супероксида и пероксинитрита при взаимодействии с ДНКЖ заключается в формировании интермедиатов содержащих связанный ONOO, распадающихся далее без образования свободных радикалов [5,6].

В модельной системе, содержащей Нерес буфер, соль Анджели, гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH) и ионы двухвалентного железа образуются органические свободные радикалы (рис. 2). Скорее всего в этих условиях при распаде органического гидропероксида образуются алкоксильные радикалы (*t*-BO[•]), которые далее окисляют Нерес до свободных радикалов. Вместе с тем, при добавлении в эту систему карнозина приводит к формированию ДНКЖ и ингибированию продукции свободных радикалов.

В наших экспериментах антиоксидантный эффект карнозиновых ДНКЖ может быть обусловлен как перехватыванием алкоксильных радикалов, так и включением в состав комплексов ионов железа. Известно, что

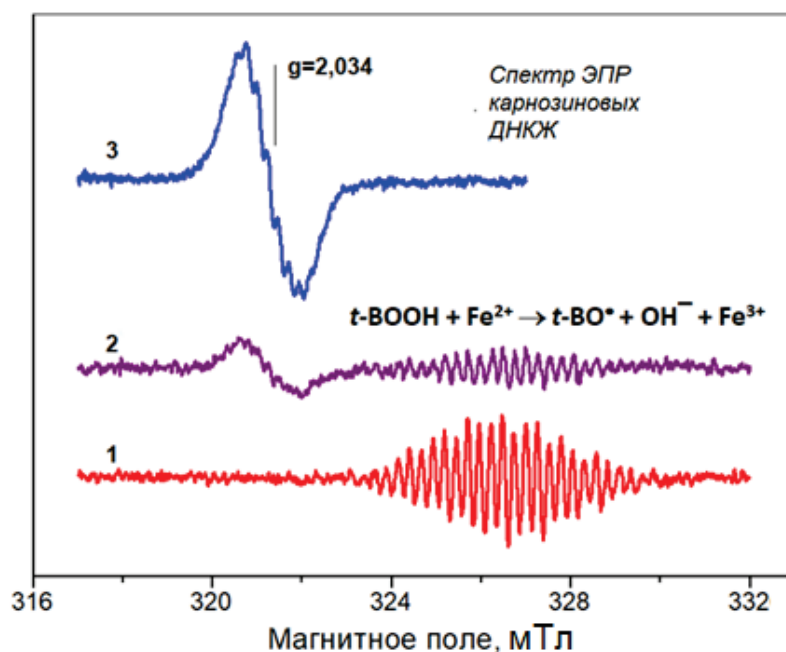


Рисунок 2. Спектры ЭПР зарегистрированные в реакционной среде содержащей 1 мМ FeSO₄, 5 мМ соли Анджели и 120 мМ Нерес буфер и 4 мМ *t*-BOOH (1); то же что (1) + 75 мМ L-карнозина (2); то же что (1) но без *t*-BOOH (3)

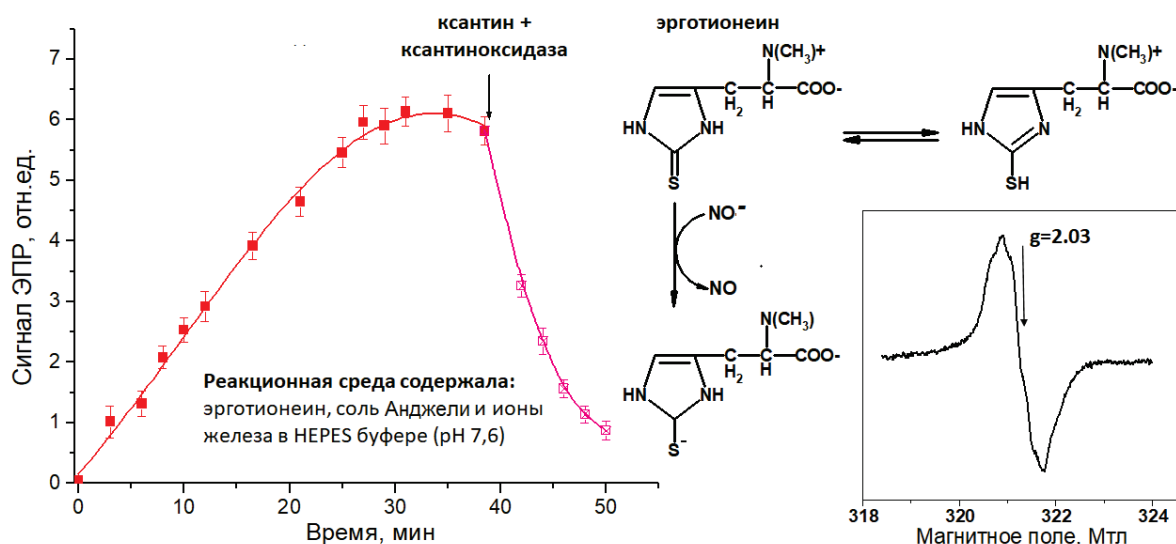


Рисунок 3. Кинетика образования и деструкции ДНКЖ связанных с L-эрготионеином. На врезке представлен спектр ЭПР этих ДНКЖ. Реакционная смесь содержала: 1 mM FeSO₄, 5 mM соли Анджели и 120 mM HEPES буфер и 10 mM L-эрготионеина. Приведена схема возможного восстановления L-эрготионенина NO⁻, в результате чего образуется тиолят-анион, который является эффективным лигандом ДНКЖ

связывание этих редокс-активных ионов в ДНКЖ предотвращает их участие в реакциях Фентоновского типа, в которых переходные металлы катализируют образование свободных радикалов [10].

Из рисунка 3 видно, что ДНКЖ связанные с L-эрготионеином, также разрушаются в условиях ферментативной генерации супероксидного радикала.

Известно, что L-эрготионеин концентрируется в митохондриях [8], которые являются одним из основных источников активных форм кислорода в клетке. На рисунке 3 представлены спектры ЭПР динитрозильных комплексов железа, связанных с АДФ. Можно предположить, что метаболизм этих комплексах также связан с митохондриями, а железо них координировано с пиррофосфатной группой.

Нельзя исключить, что ДНКЖ, связанные с L-эрготионеином и АДФ, могут участвовать в защите митохондрий от супероксидного анион-радикала, который генерируется дыхательной цепью этих органелл. Следует отметить, что ранее нами было обнаружено формирование ДНКЖ в изолированных митохондриях из сердца крыс [7].

Таким образом, обнаруженные нами новые варианты ДНКЖ, как и тиолсодержащие комплексы, могут быть компонентами антиоксидантных систем, локализованных в различных тканях организма. Мы также полагаем, что ДНКЖ играют роль низкомолекулярных редокс-триггеров, регулирующих ответ клетки на окислительный

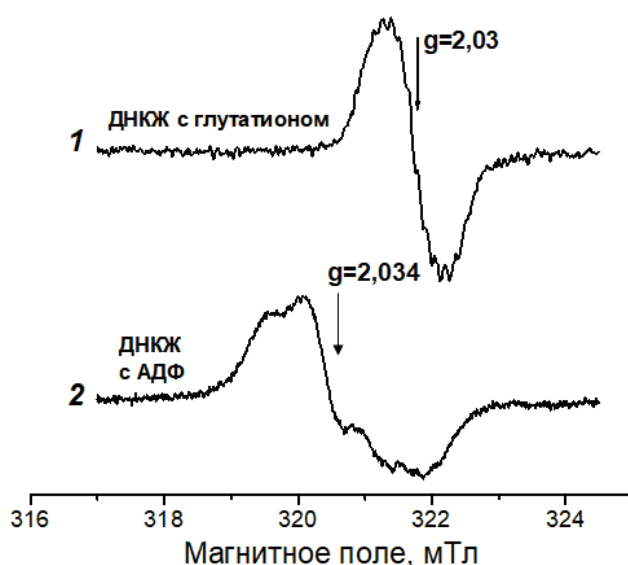


Рисунок 4. Типичный спектр ЭПР глутатионовых ДНКЖ (1), а также спектр ДНКЖ связанных с АДФ (2). Последний спектр был зарегистрирован в реакционной среде содержащей: 40 mM HEPES буфер (pH 7,6), 0,5 mM FeSO₄, 10 mM соли Анджели и 10 mM АДФ

стресс, причём различные лиганды комплексов позволяют осуществлять тонкую настройку этой регуляции. Кроме того, на основе новых вариантов ДНКЖ могут быть разработаны перспективные фармакологические средства, обладающие комплексным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Lehnert N. et al. The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity. *Chem. Rev.*, 2021, vol. 121, no. 24, pp. 14682-14905.
2. Vanin A.F. Physico-Chemistry of Dinitrosyl Iron Complexes as a Determinant of Their Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 10356.
3. Shumaev K.B. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 37-46.
4. Shumaev K.B. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, vol. 2019, art. id 2798154, 12 p.
5. Шумаев К.Б. и др. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. *Биомедицинская химия*, 2021, т. 67, № 2, с. 162-168. [Shumaev K.B. et al. Probable mechanism of antioxidant action of iron dinitrosyl complexes. *Biomedical Chemistry*, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 162-168. (In Russ.)]
6. Kosmachevskaya O.V. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 13649.
7. Shumaev K.B. et al. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria. *Biofactors*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 237-244.
8. Paul B.D., Snyder S.H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ.*, 2010, vol. 17, no. 7, pp. 1134-1140.
9. Prokopieva et al. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, vol. 2016, art. id 2939087, 8 p.
10. Li Q. et al. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 19917-19927.

NEW VARIANTS OF DINITROSYL IRON COMPLEXES. ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL EFFECT **Shumaev K.B.^{1,2}, Kosmachevskaya O.V.¹, Topunov A.F.¹, Grachev D.I.^{2,3}, Nasybullina E.I.¹, Pugachenko I.S.¹, Ruuge E.K.^{2,3}**

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology RAS

Leninsky pr-t, 33/2, Moscow, 119071, Russia

² E.I. Chazov National Medical Research Centre of Cardiology
st. 3rd Cherepkovskaya, 15a, Moscow, 121552, Russia

³ Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: tomorrow@mail.ru

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2022.0572

Abstract. Dinitrosyl iron complexes (DNICs) are important metabolites of nitric oxide (NO) with a wide range of biological activity. The properties of these complexes are determined not only by NO-ligands, but also by other components included in their composition. Using EPR spectroscopy, it was shown that iron in the DNICs can be bound to carnosine, L-ergothioneine and ADP. New variants of DNICs are formed with the participation of a nitroxyl anion, which is a product of one-electron reduction of NO. In model systems, DNICs associated with carnosine and ergothioneine reduce the level of various free radicals. These DNICs intercept the superoxide anion radical, which is a precursor to other reactive oxygen and nitrogen species. At the same time, carnosine-bound DNICs reduce the concentration of organic free radicals in a system containing a nitroxyl anion, iron ions and tert-butyl hydroperoxide. On the other hand, DNICs associated with ergothioneine and ADP may play an important role in the protection of mitochondria. It has been suggested that the new DNICs may be components of antioxidant systems localized in various tissues of the body, as well as redox triggers regulating the cellular response to oxidative stress.

Key words: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, free radical, EPR spectroscopy.