

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ С АКТИВНЫМИ ДИКАРБОНИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

© 2017 г. К.Б. Шумаев\* \*\*, В.З. Ланкин\*, Г.Г. Коновалова\*,  
А.К. Тихазе\*, Э.К. Рууге\*

\*Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а;

\*\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: tomorov@mail.ru

Поступила в редакцию 04.05.16 г.

Исследовано взаимодействие супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) с активными дикарбонильными – метилглиоксалем, глиоксалем и малоновым диальдегидом. Показано, что глиоксаль и метилглиоксаль ингибировали супероксид-зависимое накопление формазана, однако малоновый диальдегид стимулировал этот процесс. Образование  $O_2^{\bullet-}$  в этих экспериментах происходило при декомпозиции азоинициатора SOTS-1. С другой стороны, в этой системе генерирования  $O_2^{\bullet-}$  все исследуемые дикарбонилы конкурировали за супероксид со спиновой ловушкой TIRON. Эти соединения также ингибировали люминол-зависимую хемилюминесценцию при индуцированном азоинициатором AIBN перекисном окислении липосом из яичного фосфатидилхолина. Предложен механизм антирадикального и антиоксидантного действия исследуемых дикарбониллов, предполагающий образование свободнорадикальных интермедиатов в их реакциях с  $O_2^{\bullet-}$  или его протонированной формой.

*Ключевые слова:* дикарбонилы, супероксидные радикалы, карбонильный и окислительный стресс.

Известно, что в условиях карбонильного стресса активные дикарбонильные соединения вызывают неферментативное гликирование биополимеров [1–8], причем эти процессы сопровождаются генерированием активных форм кислорода и азота [3–10]. Накопление дикарбонильных соединений, таких как метилглиоксаль, глиоксаль и малоновый диальдегид, наблюдается при диабетической гипергликемии, а также других заболеваниях, связанных с карбонильным и окислительным стрессом [2–9]. В организме животных метилглиоксаль образуется в ходе гликолиза, метаболизма треонина и ацетона [2–5]. Источником метилглиоксаля и глиоксаля является также окислительная деградация глюкозы и гликированных белков [2–4]. Кроме того, глиоксаль и малоновый диальдегид продуцируются при свободнорадикальном перекисном окислении полиненасыщенных жирных кислот [1–3,7]. Ранее мы обнаружили, что при взаимодействии метилглиоксаля с амино-

кислотами (реакция Майяра) продуцируется супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) [10]. Нужно отметить, что в живых системах  $O_2^{\bullet-}$  является предшественником других активных форм кислорода и пероксинитрита [11,12]. С другой стороны, метилглиоксаль и глиоксаль обладают антирадикальными свойствами и эффективно перехватывают гидроксильный радикал, причем константы этих реакций выше, чем в подобных реакциях с известными фенольными антиоксидантами [13]. В работе [12] показано, что метилглиоксаль также реагирует с пероксинитритом с образованием производных, при распаде которых может продуцироваться диоксид азота. Следует отметить, что еще в 1967 г. предположение о важной роли метилглиоксаля и глиоксаля в регуляции редокс-процессов в клетке высказал лауреат Нобелевской премии А. Сент-Дьёрди [3,14]. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные об антирадикальном действии малонового диальдегида. Исходя из этого, в данной работе мы исследовали взаимодействие природных дикарбонильных соединений с супероксидом.

Сокращения: SOTS-1 – бис(4-карбоксибензил)гипонитрит, TIRON – 4,5-дигидроксибензол-1,3-дисульфат натрия, AIBN – азобисбутиронитрил.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Генерирование супероксидных анион-радикалов.** Супероксидные радикалы генерировали в ферментативной системе ксантин–ксантинооксидаза [15], а также в условиях декомпозиции азоинициатора SOTS-1 (ди-(4-карбоксибензил)гипонитрита) [16]. Образование  $O_2^{\bullet-}$  определяли двумя независимыми методами: с помощью спиновой ловушки супероксида TIRON (4,5-дигидроксибензол-1,3-дисульфоната натрия) [17,18] и по восстановлению синего нитротетразолия [10]. Кинетику накопления продукта восстановления синего нитротетразолия – формазана – регистрировали по поглощению при 560 нм на спектрофотометре Shimadzu (Япония). В опытах с SOTS-1 продукцию  $O_2^{\bullet-}$  инициировали введением 50 мкМ азоинициатора в среду, содержащую 0,5 мМ синего нитротетразолия и другие добавки в диметилсульфоксиде. Активность ксантинооксидазы оценивали по поглощению продукта ферментативного окисления ксантина – урата при 290 нм [19].

**Регистрация спектров ЭПР.** Регистрация спектров ЭПР семихинона тайрона проводилась на спектрометре E-109E (Varian, США) при температуре 25°C. Условия регистрации: мощность СВЧ 5 мВт, частота СВ 9,15 ГГц, амплитуда ВЧ-модуляции 0,05 мТл [18]. Образцы объемом 80 мкл вводили в стеклянные капилляры, которые далее помещали в кварцевую трубку в активной зоне резонатора.

**Хемилюминесценция.** Кинетику люминол-зависимой хемилюминесценции регистрировали на люминометре Lum-5773 (Россия) в реакционной среде, содержащей: 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (рН ~ 7,8), липосомы и 2 мМ люминола. Инкубация в ходе измерения проводилась при температуре 50°C и постоянном перемешивании реакционной среды. Липосомы из яичного L- $\alpha$ -фосфатидилхолина, содержавшие гидрофобный азоинициатор – азобисбутиронитрил (AIBN), получали, как описано в работе [8].

В работе использовали метилглиоксаль, глиоксаль, 1,1,3,3-тетраэтоксипропан, синий нитротетразолий, супероксиддисмутаза, ксантин, ксантинооксидазу, яичный фосфатидилхолин, люминол, TIRON, AIBN – фирмы Sigma-Aldrich (США) и SOTS-1 – от Sauman Europa (Эстония). Малоновый диальдегид получали путем кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраэтоксипропана, как описано в работе [20].

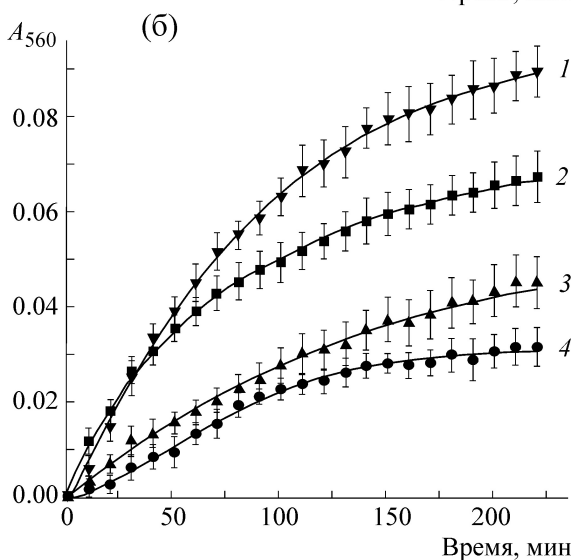
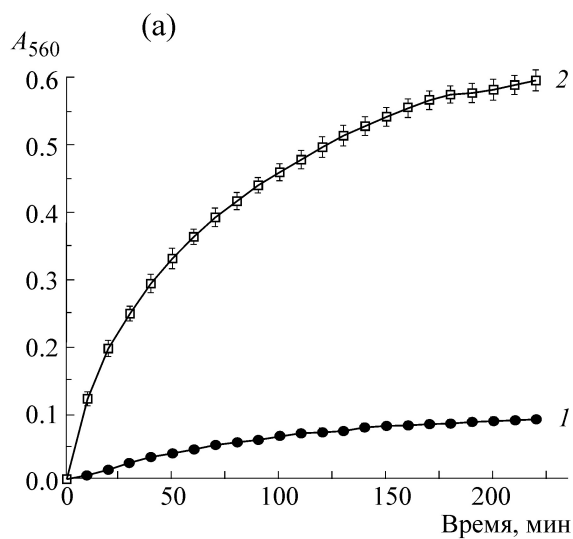
**Обработка результатов.** Статистическую обработку данных проводили по *t*-тесту и тесту ANOVA, используя приложения программы

Origin 7 фирмы OriginLab Corporation (США). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах было показано, что метилглиоксаль ингибирует восстановление синего нитротетразолия в условиях генерирования супероксидного радикала в системе ксантин–ксантинооксидаза в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 10 мМ, однако при высоких концентрациях этого  $\alpha$ -оксоальдегида наблюдалось заметное ингибирование активности ксантинооксидазы (данные не приведены). В дальнейшем мы использовали неферментативный способ генерирования супероксида при декомпозиции азоинициатора SOTS-1 [16]. Из рис. 1а видно, что в этой системе малоновый диальдегид резко стимулировал восстановление синего нитротетразолия. В то же время глиоксаль и метилглиоксаль в концентрации 5 мМ, напротив, ингибируют супероксидзависимое накопление формазана (рис. 1б). Метилглиоксаль в этих условиях подавляет накопление формазана значительно эффективнее, чем глиоксаль, причем его действие сопоставимо с эффектом ловушки супероксида TIRON. Известно, что при взаимодействии TIRON с супероксидом образуется семихинон с характерным спектром ЭПР [17,18]. С помощью спектроскопии ЭПР нами установлено, что метилглиоксаль и глиоксаль в концентрации 250 мкМ снижают уровень семихинона TIRON в условиях генерирования  $O_2^{\bullet-}$  при декомпозиции SOTS-1 более чем на 75% (рис. 2). Важно отметить, что в этих же условиях малоновый диальдегид ингибирует супероксид-зависимое образование семихинона TIRON заметно менее эффективно, чем метилглиоксаль и глиоксаль (рис. 2). Таким образом, полученные результаты указывают на конкуренцию исследуемых дикарбонильных соединений за супероксид с TIRON, скорость реакции которого с  $O_2^{\bullet-}$  весьма высока ( $k = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [17].

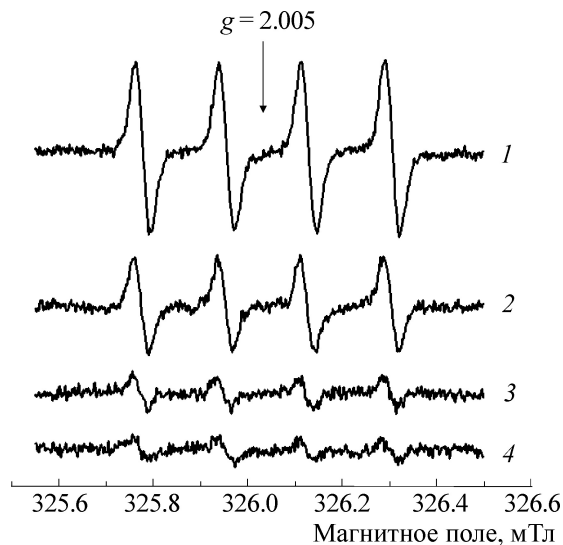
Ранее было обнаружено, что  $O_2^{\bullet-}$  образуется также при AIBN-инициированном перекисном окислении липосом из яичного фосфатидилхолина [8], поскольку в этой системе введение супероксиддисмутаза полностью подавляло люминол-зависимую хемилюминесценцию (рис. 3, кривая 5). Из представленных на рис. 3 результатов видно, что все исследуемые дикарбонильные соединения в концентрации 100 мкМ подавляли хемилюминесценцию, причем наиболее эффективным ингибитором был метилглиок-



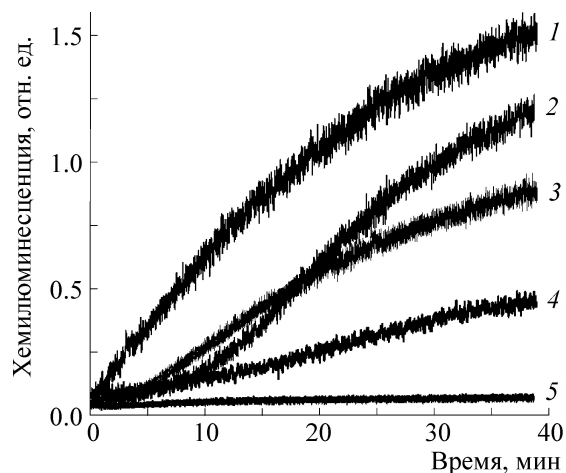
**Рис. 1.** Влияние различных дикарбонильных соединений на накопление формазана в условиях генерирования супероксидного радикала при декомпозиции SOTS-1: (а) – кинетика накопления формазана в реакционной среде без добавок (контроль) (кривая 1) или в присутствии малонового диальдегида (кривая 2); (б) – контроль (кривая 1), кинетика в присутствии глиоксаля (кривая 2), метилглиоксаля (кривая 3) и TIRON (кривая 4). Концентрация дикарбониллов и TIRON составляла 5 мМ.

саль (рис. 3, кривые 1–4). Эти результаты указывают на то, что исследованные дикарбонилы могут взаимодействовать не только с супероксидом, но с различными интермедиатами свободнорадикального окисления полиеновых липидов.

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование дикарбониллов, имеющих сходную химическую структуру (рис. 4а). В различных экспериментальных системах показано, что метилглиоксаль и глиоксаль спо-

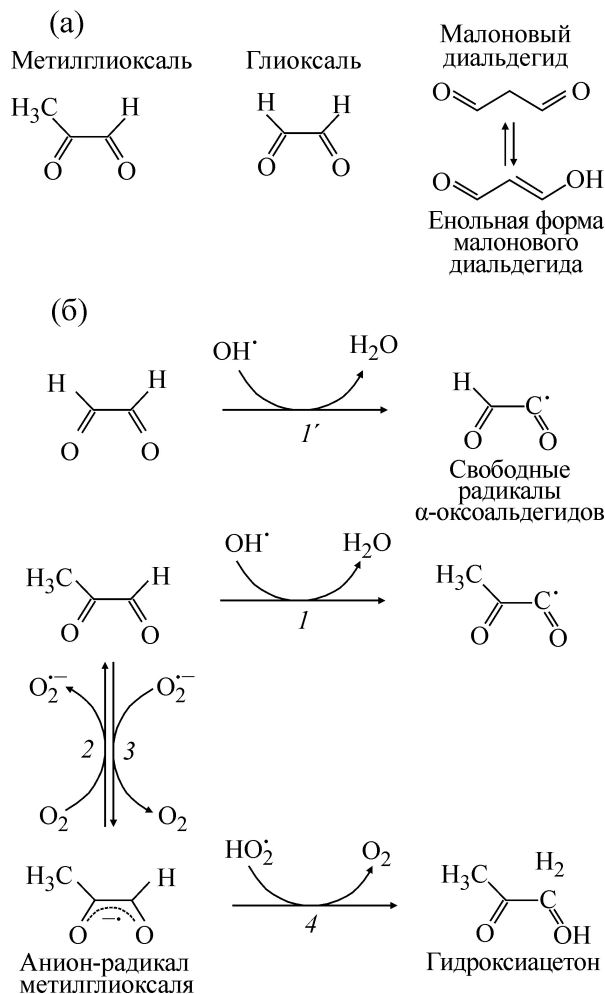


**Рис. 2.** Спектр ЭПР семихинона TIRON в системе зависимо от SOTS-1 генерирования  $O_2^{\cdot-}$  (1); то же в присутствии малонового диальдегида (2), метилглиоксаля (3) и глиоксаля (4). Реакционная среда содержала 100 мкМ SOTS-1 и 10 мМ TIRON в смеси диметилсульфоксид/К,Na-фосфатный буфер (рН 7,4; 0,1 М) в соотношении 1 : 1. Концентрация добавленных дикарбониллов составляла 0,25 мМ. Спектры регистрировали после 5 мин инкубации среды.



**Рис. 3.** Характерные кинетические кривые люминол-зависимой хемилуминесценции при индуцированном AIBN свободнорадикальном окислении липосом из яичного фосфатидилхолина без добавок (1) и в присутствии глиоксаля (2), малонового диальдегида (3), метилглиоксаля (4), супероксиддисмутазы (600 ед/мл) (5). Концентрация дикарбониллов составляла 0,1 мМ. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Различия кривых хемилуминесценции в однотипных экспериментах не превышало 7%.

собны перехватывать  $O_2^{\cdot-}$  в широком диапазоне концентраций (рис. 1–3), включая концентра-



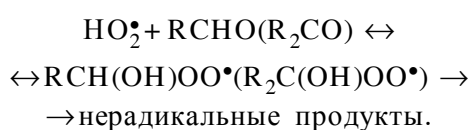
**Рис. 4.** Химическая структура (а) и гипотетические механизмы антирадикального, антиоксидантного и/или прооксидантного действия дикарбонильных соединений (б). Реакции гидроксильного радикала с метилглиоксалем и глиоксалем (1 и 1') предложена в работе [13]. Реакции одноэлектронного восстановления кислорода анион-радикалом метилглиоксала (2) и восстановления этого радикала супероксидом с образованием гидроксиацетона (4) постулированы в работе [10].

ции, используемые при моделировании сахарного диабета и других патологий [6–8]. Усиление восстановления синего нитротетразолия при генерировании  $O_2^{\bullet-}$  в присутствии малонового диальдегида, по-видимому, является артефактом данного метода. Действительно известно, что синий нитротетразолий восстанавливается до формазана различными биомолекулами [21], в том числе продуктом неферментативного гликирования – фруктозаминном [22], причем в последнем случае синий нитротетразолий взаимодействует с енолят-анионом и образующимся при его окислении свободным радикалом. Нельзя исключить, что в системе с SOTS-1 и малоновым диальдегидом образуются сходные интермедиаты. Вместе с тем в других использованных нами модельных системах малоновый диальдегид проявляет антирадикальное и анти-

оксидантное действие, хотя и меньшее, чем у его изомера метилглиоксала (рис. 2 и 3).

В работе [13] показано, что метилглиоксаль и глиоксаль эффективно перехватывают гидроксильный радикал с образованием С-центрированных радикалов (см. схему на рис. 4). С другой стороны, ранее нами продемонстрировано [10], что при взаимодействии L-лизина с метилглиоксалем (реакция Майяра) может продуцироваться анион-радикал этого дикарбонила, который способен восстанавливать кислород по одноэлектронному механизму с образованием  $O_2^{\bullet-}$  (рис. 4б). Мы полагаем, что данный механизм может лежать в основе прооксидантного действия метилглиоксала. С этим предположением согласуется то, что в ранее проведенных нами клинических исследованиях при терапии больных сахарным диабетом пре-

паратом из группы бигуанидов – метформином, способным утилизировать метилглиоксаль, наблюдается резкое снижение продуктов свободнорадикального окисления в плазме крови [8,23]. Можно предположить, что в наших экспериментах антиоксидантные свойства метилглиоксаля связаны с обратимостью реакции образования  $O_2^{\cdot-}$  (рис. 4б). В этом случае при взаимодействии  $O_2^{\cdot-}$  с метилглиоксалем, вероятно, продуцируется анион-радикал (семидион) дикарбонила. В свою очередь семидион метилглиоксаля, как мы предположили в предшествующей работе [10], нейтрализует еще одну молекулу супероксида с образованием нерадикального продукта, вероятно, гидроксиацетона (рис. 4). Известно, что при одноэлектронном восстановлении глиоксаля также образуется семидион [24], причем донором электронов могут быть некоторые органические анион-радикалы [25]. Исходя из этого можно предположить, что предлагаемый нами антиоксидантный механизм действия метилглиоксаля применим и к глиоксалу. В то же время нельзя исключить одноэлектронного окисления или восстановления малонового диальдегида в реакции с супероксидом или его протонированной формой ( $HO_2^{\cdot}$ ), исходя из того, что окисление малонового диальдегида до С-центрированного свободного радикала показано в работе [26]. Кроме того, известно, что  $HO_2^{\cdot}$  может взаимодействовать с альдегидами и кетонами с образованием гидрокси-алкилпероксильных радикалов по следующей реакции [27]:



Представляется достаточно вероятным, что по аналогичному механизму с  $HO_2^{\cdot}$  могут реагировать все исследованные нами дикарбонильные соединения.

Таким образом, изученные дикарбонильные соединения в определенных условиях способны перехватывать свободные радикалы кислорода, хотя механизмы такого антирадикального и антиоксидантного действия нуждаются в дальнейшем исследовании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00245).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Ishii, S. Kumazawa, T. Sakurai, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 122 (2006).
2. C. G. Schalkwijk, *Immun. Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* **7**, 57 (2007).
3. P. J. Thornalley, *Drug Metabol. Drug Interact.* **23**, 125 (2008).
4. K. M. Desai and L. Wu, *Drug. Metabol. Drug. Interact.* **23**, 151 (2008).
5. P. B. L. Pun and M. P. Murphy, *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 1 (2012).
6. M. Katakura, M. Hashimoto, Y. Tanabe, and O. Shido. *Medic. Gas Res.* **2**, 1 (2012).
7. V. U. Chavan and R. R. Melinkeri, *Natl. J. Community Med.* **4**, 294 (2013).
8. V. Z. Lankin, G. G. Konovalova, A. K. Tikhaze, et al., *Mol. Cell. Biochem.* **395**, 241 (2014).
9. M.-S. Hsieh and W.-H. Chan, *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1445 (2009).
10. К. Б. Шумаев, С. А. Губкина, Е. М. Кумскова и др., *Биохимия* **74**, 568 (2009).
11. J. F. Turrens, *J. Physiol.* **552**, 335 (2003).
12. J. Massari, R. Tokikawa, L. Zanolli, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1762 (2010).
13. Y. Matsumura, A. Iwasawa, T. Kobayashi, et al., *J. Clin. Biochem. Nutr.* **52**, 128 (2013).
14. A. Szent-Gyorgyi, L. G. Egyud, and J. A. McLaughlin, *Science* **155**, 539 (1967).
15. C. Beauchamp and I. Fridovich, *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).
16. M. I. Heller and P. L. Croot, *Anal. Chim. Acta* **667**, 1 (2010).
17. C. L. Greenstock and R. W. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 11 (1975).
18. О. В. Коркина и Э. К. Рюге, *Биофизика* **45**, 695 (2000).
19. H. U. Bergmeyer, K. Gawehn, and M. Grassl, in *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. by H. U. Bergmeyer, 2<sup>nd</sup> ed. (Acad. Press, New York, 1974), Vol. **1**, pp. 521–522.
20. L. J. Marnett, M. J. Bienkowski, M. Raban, and M. A. Tuttle, *Anal. Biochem.* **99**, 458 (1979).
21. C. Achilli, S. Grandi, A. Ciana, et al., *Chem. Papers* **68**, 662 (2014).
22. J. R. Baker, D. V. Zyzak, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes, *Clin. Chem.* **40**, 1950 (1994).
23. V. Z. Lankin, G. G. Konovalova, A. K. Tikhaze, et al., in: *Handbook of Lipoprotein Research* (NOVASci. Publish., New York, 2010), pp. 85–107.
24. W. M. Tolles and D. W. Moore, *J. Chem. Phys.* **46**, 2102 (1967).
25. C. Thomson, *J. Biol. Phys.* **7**, 39 (1979).
26. C. Mottley, R. E. Robinson, and R. P. Mason, *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 153 (1991).
27. I. Hermans, J. F. Müller, T. L. Nguyen, et al., *J. Phys. Chem. A* **109**, 4303 (2005).

## Interaction of Superoxide Radicals with Reactive Dicarbonyl Compounds

**K.B. Shumaev\* \*\*, V.Z. Lankin\*, G.G. Konovalova\*,  
A.K. Tikhaze\*, and E.K. Ruuge\***

*\*Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Health of the Russian Federation,  
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia*

*\*\*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology",  
Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, bld. 2, Moscow, 119071 Russia*

In this paper, we studied the interaction of superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet -}$ ) with reactive dicarbonyl compounds (methylglyoxal, glyoxal and malondialdehyde). It was shown that glyoxal and methylglyoxal inhibited superoxide-dependent accumulation of formazan while malondialdehyde stimulated this process. The generation of  $O_2^{\bullet -}$  in these experiments occurred during decomposition of an azo-initiator, SOTS-1. However, in this  $O_2^{\bullet -}$  generation system all studied dicarbonyls were competing for the superoxide with TIRON spin trap. These compounds also inhibited luminol-dependent chemiluminescence in the system of egg phosphatidylcholine liposome peroxidation induced by the azo-initiator AIBN. The mechanism of antiradical and antioxidant action of the studied dicarbonyl compounds, that implies the formation of free radical intermediates in their reactions with  $O_2^{\bullet -}$  or its protonated form, is suggested.

*Key words: dicarbonyls, superoxide radicals, carbonyl and oxidative stress*