

УДК 541.451+542.978+577.158.52

## ПРИРОДНЫЕ ДИКАРБОНИЛЫ ИНГИБИРУЮТ ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ

В. З. Ланкин<sup>1,\*</sup>, М. Г. Шарапов<sup>2</sup>, Р. Г. Гончаров<sup>2</sup>, А. К. Тихазе<sup>1</sup>, В. И. Новоселов<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН М.А. Островским 18.09.2018 г.

Поступило 21.09.2018 г.

Установлено, что рекомбинантные пероксиредоксины человека (Prx1, Prx2, Prx4 и Prx6) ингибируют природные дикарбонилы, образующиеся при свободнорадикальном окислении ненасыщенных липидов (малоновый диальдегид) и окислительных превращениях глюкозы (глиоксаль, метилглиоксаль). Обсуждается возможная роль снижения активности пероксиредоксинов при окислительном и карбонильном стрессе в качестве важного фактора, включающего молекулярные механизмы повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете.

*Ключевые слова:* окислительно/карбонильный стресс, антиоксидантные ферменты, пероксиредоксины, природные дикарбонилы.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524853377-380>

Наряду с “классическими” антиоксидантными ферментами (АОФ), такими как супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (GSH-Px), глутатион-S-трансферазы и каталаза (КАТ), в тканях млекопитающих и человека присутствуют представители другого семейства АОФ — пероксиредоксины (Prx1–6) [1]. Подобно КАТ и Se-содержащим глутатионпероксидазам, серусодержащие пероксиредоксины утилизируют пероксид водорода, причём Prx6, как и GSH-Px4, может восстанавливать органические гидропероксиды, в том числе гидропероксиды полиеновых жирных кислот и гидропероксиацилы ненасыщенных фосфолипидов [2, 3]. В некоторых тканях пероксиредоксинам принадлежит ведущая роль в детоксикации активных форм кислорода (АФК), в частности, наличие высоких уровней этих ферментов в лёгочном эпителии [4], несомненно, играет большую роль в защите организма от токсического действия кислорода. Нами было установлено [5], что для эндотелиоцитов человека характерен высокий уровень экспрессии генов пероксиредоксинов, но не экспрессии генов “классических” АОФ, что свидетельствует о преимущественном участии пероксиредоксинов в предотвращении повреждающего действия продуктов свободнорадикального окисления в эндотелии. Ранее [6] нами было показано, что природные дикарбонилы,

образующиеся при интенсификации свободнорадикального окисления липидов (окислительный стресс) в процессе деструкции первичных продуктов — липогидропероксидов (малоновый диальдегид, МДА) и в процессе аутоокисления и ферментативного окисления глюкозы (карбонильный стресс) — глиоксаль (Glx) и метилглиоксаль (MGlx) — ингибируют активность СОД и Se-содержащей GSH-Px *in vitro* и *in vivo*. Также имеются данные [7], что метаболический предшественник МДА — 4-гидроксиноненаль — может играть важную роль в патогенезе атеросклероза и сахарного диабета. Результаты исследования кинетических параметров Se-содержащей GSH-Px в присутствии МДА, Glx, MGlx в разных концентрациях позволяют полагать, что снижение активности АОФ при действии природных дикарбонилов сопряжено со структурной модификацией аминокислотных остатков в активном центре фермента [8]. Можно полагать, что установленная нами впервые особенность защитной ферментной системы эндотелиоцитов (преобладание экспрессии пероксиредоксинов над синтезом “классических” АОФ) может “давать сбой” в условиях окислительного/карбонильного стресса при развитии атеросклероза и сахарного диабета. Исходя из вышесказанного представлялось весьма важным исследовать влияние природных дикарбонилов (МДА, Glx, MGlx) в разных концентрациях на пероксидазную активность (субстрат — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) рекомбинантных пероксиредоксинов (Prx1, Prx2, Prx4 и Prx6) человека, что и составило предмет настоящего исследования.

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, Москва

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки

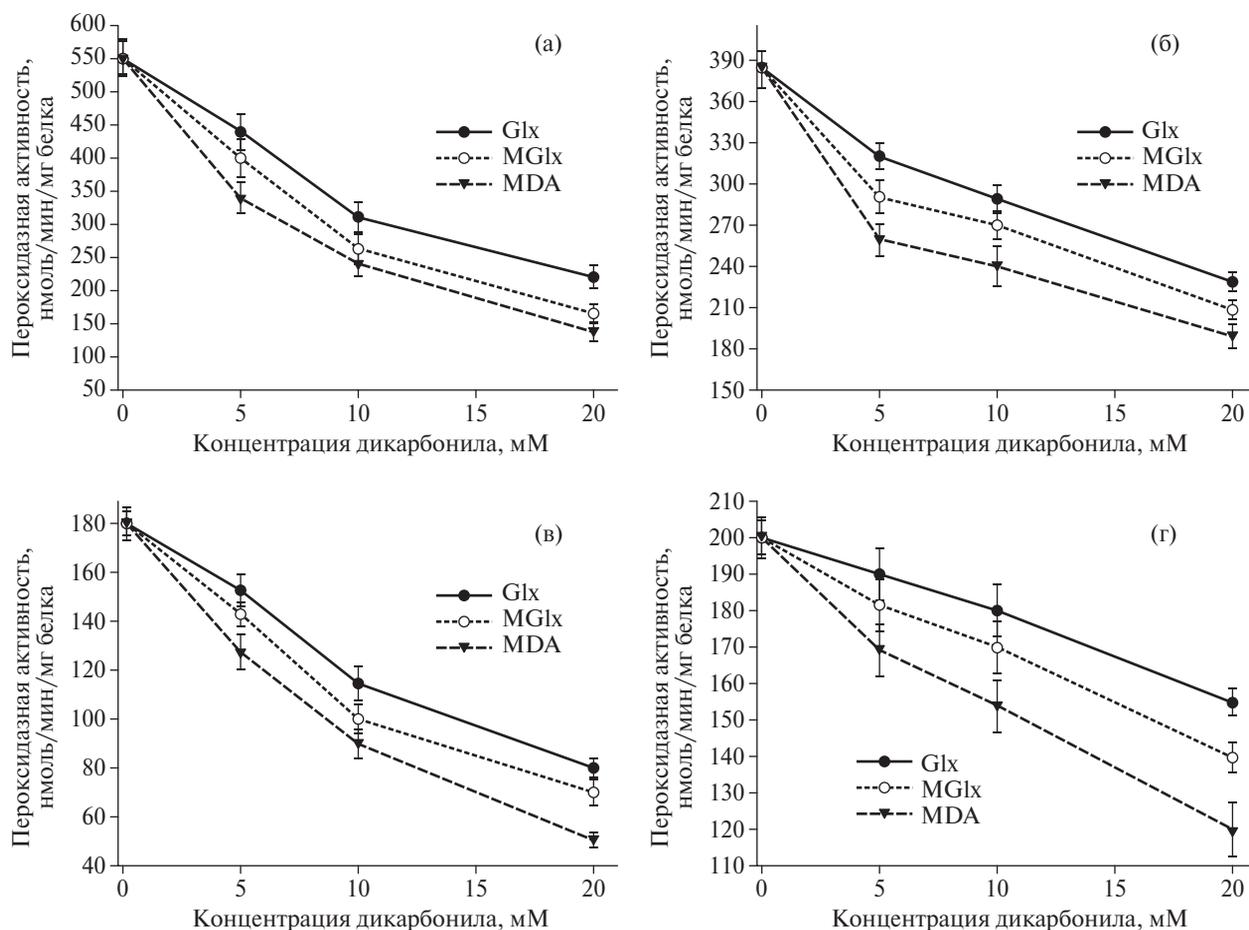
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.

\*E-mail: [lankin941@mail.ru](mailto:lankin941@mail.ru)

Генно-инженерные конструкции, содержащие гены Prx1–6 человека, были получены ранее с помощью стандартных молекулярно-биологических методов [9]. Эти конструкции использовали для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) и синтеза пероксиредоксинов. В ходе синтеза в клетках *E. coli* митохондриальные белки Prx3 и Prx5 образуют водонерастворимые тельца включений, поэтому эти ферменты выделяли в денатурирующих условиях с помощью 8 М раствора мочевины. Тем не менее при ренатурации (ступенчатом диализе растворами с понижающейся концентрацией мочевины) наблюдалась значительная агрегация белков, что не позволило получить достаточное количество белка с воспроизводимой пероксидазной активностью, вследствие чего в дальнейшей работе мы не использовали Prx3 и Prx5. Растворы Glx, MGlx и МДА (МДА получали путём кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраэтоксипропана) в Na-фосфатном буфере, pH 7,4 готовили *ex tempore* (все реагенты “Sigma-Aldrich”, США). Растворы исследуемых пероксиредоксинов (4 мг/мл) инкубировали при 37 °С в течение 1 ч в присутствии дикарбониллов (МДА, Glx, MGlx) в концентрациях 5, 10, 20 мМ соответственно. Далее ферменты связывали с агарозой Ni-NTA и снова проводили их очистку с целью избавления от дикарбониллов перед измерением пероксидазной активности пероксиредоксинов, поскольку дикарбониллы способны восстанавливать гидропероксиды. Пероксидазную активность пероксиредоксинов определяли согласно работе [10] с небольшими модификациями. К 45 мкл раствора исследуемого пероксиредоксина (0,1 мг/мл), очищенного после инкубации с дикарбонилами, добавляли 5 мкл 100 мМ раствора дитиотреитола и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин для полного восстановления окисленного цистеина в пероксидазном активном центре фермента. Затем в инкубационную смесь вносили 100 мкл субстрата (200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и инкубировали в течение 5 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 0,6 М HCl, затем приливали 100 мкл 10 мМ Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> + 50 мкл 2,5 М KSCN и определяли концентрацию образовавшегося комплексного соединения железа при 492 нм (концентрация непрореагировавшей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пропорциональна интенсивности окраски). Измерения в каждой экспериментальной точке проводили не менее трёх раз.

Результаты исследования по влиянию дикарбониллов на пероксидазную активность пероксиредоксинов представлены на рис. 1. Из рисунка видно, что все исследованные дикарбониллы ингибировали

пероксидазную активность Prx1, Prx2, Prx4 и Prx6. Этот эффект усиливался в ряду Glx > MGlx > МДА и возрастал с увеличением концентрации дикарбониллов. Согласно современной классификации, исследованный нами пероксиредоксин Prx6 относится к подсемейству 1-Cys Prx<sub>s</sub>, в N-концевой области которых располагается обеспечивающий катализ “пероксидазный” цистеин C<sub>p</sub> (peroxidatic cysteine), а Prx1, Prx2 и Prx4 относятся к подсемейству 2-Cys Prx<sub>s</sub> (кроме C<sub>p</sub> в C-концевой области содержат “восстанавливающий” остаток цистеина C<sub>R</sub> — resolving cysteine) [11, 12]. Очевидно, что тиолы являются наиболее доступными мишенями для действия дикарбониллов. В частности, продуктами реакции цистеина с MGlx являются тиогемиацетали, причём подобная модификация цистеина необратима и должна приводить к быстрой инактивации в первую очередь 2-Cys Prx<sub>s</sub> [13, 14]. В связи с этим снижение активности пероксиредоксинов при инкубации с дикарбонилами, несомненно, связано с модификацией цистеиновых остатков в молекулах ферментов. “Восстанавливающий” C<sub>R</sub>-цистеин локализован на поверхности молекулы фермента, что делает его более доступным для модификации дикарбонилами [11, 12]. В соответствии с этим 2-Cys Prx<sub>s</sub> (Prx1, Prx2, Prx4) не только обладают большей исходной каталитической активностью, но и более чувствительны к действию дикарбониллов, чем Prx6, относящийся к подсемейству 1-Cys Prx<sub>s</sub> (рис. 1). Так, при минимальной концентрации дикарбониллов (5 мМ) их ингибирующий эффект возрастал в ряду Glx > MGlx > МДА: 20, 28 и 39% соответственно для Prx1; 17, 25 и 32,5% соответственно для Prx2 и 19,5; 24 и 34% соответственно для Prx4 (рис. 1). Следует отметить, что Prx4 может быть непосредственно вовлечён в защиту эндотелиальных клеток от действия АФК и функционирует в эндотелиоцитах как мембранно-ассоциированная пероксидаза [15]. Ингибирование активности Prx6 при той же концентрации дикарбониллов в среде инкубации было менее выражено и в ряду Glx > MGlx > МДА и составило всего 0; 4 и 10,5% соответственно (рис. 1). Следует отметить, что величины исходной пероксидазной активности Prx4 (2-Cys Prx) и Prx6 (1-Cys Prx) были сопоставимы (рис. 1). Таким образом, все исследуемые дикарбониллы существенно подавляли пероксидазную активность 2-Cys Prx<sub>s</sub> (Prx1, Prx2 и Prx4), тогда как пероксидазная активность 1-Cys Prx (Prx6) была менее подвержена модифицирующему действию этих соединений. Необходимо отметить, что в проведённом нами ранее [8] исследовании по изучению действия дикарбониллов на активность эритроцитарной Se-содержащей GSH-Px, как и в на-



**Рис. 1.** Влияние разных концентраций природных дикарбониллов — глиоксаля (Glx), метилглиоксаля (MGlx) и малонового диальдегида (МДА) — на пероксидазную активность рекомбинантных пероксиредоксинов человека. (а) — пероксиредоксин 1 (Prx1), (б) — пероксиредоксин 2 (Prx2), (в) — пероксиредоксин 4 (Prx4), (г) — пероксиредоксин 6 (Prx6).  $M \pm m$ ,  $n = 3$ .

стоящей работе, было обнаружено ингибирование пероксидазной активности этого фермента, причём ингибирующее действие МДА было существенно выше, чем ингибирующее действие Glx. В отличие от настоящей работы, ингибирование глутатионпероксидазы было более выраженным: в течение 1–2 ч фермент терял более 80% своей активности в присутствии 10 мМ МДА, а через 3–4 ч инкубации фермента с дикарбонилами наблюдалось практически полное подавление ферментативной активности [6]. Тем не менее обнаруженное нами ингибирующее действие дикарбониллов на пероксидазную активность серусодержащих Prx<sub>x</sub> отчётливо проявлялось после инкубации в течение 1 ч при более низких (5 мМ) концентрациях этих веществ (рис. 1). Несмотря на то что при окислительном/карбонильном стрессе *in vivo* концентрация дикарбониллов в кровотоке может быть значительно ниже использованной нами в опытах *in vitro*, время действия этих веществ на эндотелиоциты *in vivo*, очевидно, может быть намного большим. Следовательно, возмож-

ность подавления активности специфичной защитной ферментной системы эндотелиоцитов при увеличении концентрации природных дикарбониллов весьма реальна и может играть важную роль в дисфункции эндотелия при атеросклерозе и сахарном диабете.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 14–15–00245 П Российского научного фонда.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seo M.S., Kang S.W., Kim K., et al. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 27. P. 20 346–20 354.
2. Hofmann B., Hecht H.H., Flohe L. // Peroxiredoxins. 2002. Biol. Chem. V. 383. № 3/4. P. 347–364.
3. Manevich Y., Shuvaeva T., Dodia C., et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2009. V. 485. P. 139–149.
4. Kinnula V.L., Lehtonen S., Kaarteenaho-Wiik R., et al. // Thorax. 2002. V. 57. № 2. P. 157–164.
5. Шаранов М.Г., Гончаров П.Г., Гордеева А.Е. и др. // ДАН. 2016. Т. 471. № 2. С. 241–244.

6. *Lankin V., Konovalova G., Tikhaze A., et al.* // Mol. Cell. Biochem. 2014. V. 395. № 1/2. P. 241–252.
7. *Chapple S.J., Cheng X., Mann G.E.* // Redox Biol. 2013. V. 1. № 5. P. 319–31.
8. *Ланкин В.З., Шумаев К.Б., Тихазе А.К., Курганов Б.И.* // ДАН. 2017. Т. 475. № 6. С. 706–709.
9. *Sharapov M.G., Penkov N.V., Gudkov S.V., et al.* // Biophysics. 2018. V. 63. № 2. P. 17–24.
10. *Kang S.W., Baines I.C., Rhee S.G.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 6303–6311.
11. *Wood Z.A., Schröder E., Robin Harris J., Poole L.B.* // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. № 1. P. 32–40.
12. *Nelson K.J., Perkins A., Van Swearingen A.E.D., et al.* // Antioxid. Redox Signal. 2018. V. 28. № 7. P. 521–536.
13. *Lo T.W.C., Westwood M.E., McLellan A.C., et al.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 32299–32305.
14. *Zeng J., Davies M.J.* // Chem. Res. Toxicol. 2006. V. 19. № 12. P. 1668–1676.
15. *Okado-Matsumoto A., Matsumoto A., Fujii J., Taniguchi N.* // J. Biochem. 2000. V. 127. № 3. P. 493–501.

## NATURAL DICARBONYLS INHIBIT PEROXIDASE ACTIVITY OF PEROXIREDOXINS

**V. Z. Lankin<sup>1</sup>, M. G. Sharapov<sup>2</sup>, R. G. Goncharov<sup>2</sup>, A. K. Tikhaze<sup>1</sup>, V. I. Novoselov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budget Organization National Medical Research Center of Cardiology,  
Ministry of Healthcare Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy Sciences, Pushchino, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS M.A. Ostrovsky September 18, 2018

Received September 21, 2018

It has been established that the activity of recombinant human peroxiredoxins (Prx1, Prx2, Prx4 and Prx6) inhibits by natural dicarbonyls formed during free radical peroxidation of unsaturated lipids (malonic dialdehyde) and oxidative transformations of glucose (glyoxal, methylglyoxal). The possible role of peroxiredoxins activity decreasing under oxidative and carbonyl stress is discussed as an important factor that includes molecular mechanisms of vascular wall damage in atherosclerosis and diabetes mellitus.

*Keywords:* oxidative/carbonyl stress, antioxidant enzymes, peroxiredoxins, natural dicarbonyls.