

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЛУТАМИЛСОДЕРЖАЩИХ И МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Фармакологические вмешательства, корректирующие гомеостаз определенных металлов, противодействуют проокислительному состоянию, протеотоксичности и увеличивают продолжительность здоровой жизни. Разработана концепция, рассматривающая металлопептиды, участвующие в поддержании редокс-потенциала клетки и оказывающие влияние на ключевые биохимические процессы, регулирующие активность металлоферментов и металлсвязывающих белков. Цель данного концептуального обзора состоит в обосновании потенциального использования металлсвязывающих и глутамилсодержащих интактных и модифицированных пептидов, активирующих систему Nrf2-Keap1, в качестве основы при разработке препаратов для терапии широкого круга заболеваний и патологических состояний (инфекционные, наследственные, ассоциированные со старением) и возможных перспектив.

**Ключевые слова:** гомеостаз металлов (металлостаз), биологически активные пептиды, металлопептиды, оксидативный стресс, Nrf2, глутатион, возрастные изменения

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Финансирование:** работа была выполнена в рамках проекта МГУ «Ноев ковчег».

**Для цитирования:** Шиловский Г.А., Путятин Т.С., Орловский И.В. Перспективы разработки и применения потенциальных антиоксидантных препаратов на основе глутамилсодержащих и металлсвязывающих пептидов. *Клиническая геронтология*. 2021; 27 (1-2): 59-63. <https://doi.org/10.26347/1607-2499202101-02059-063>

## PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF ANTIOXIDANT DRUGS BASED ON GLUTAMYL AND METAL-BINDING PEPTIDES

Pharmacological interventions that correct the homeostasis of certain metals counteract proteotoxicity and prolong healthy life. The study has developed a concept that considers metallopeptides involved in maintaining the redox potential of a cell and influencing key biochemical processes that regulate the activity of metalloenzymes and metal-binding proteins. The purpose of this conceptual review is to substantiate the potential use of metal-binding and glutamyl-containing intact and modified peptides that activate the Nrf2-Keap1 system as a basis for the development of drugs for the treatment of a wide range of diseases and pathological (infectious, hereditary, associated with aging) conditions and prospective projects.

**Keywords:** metals homeostasis (metallostasis), biologically active peptides, metallopeptides, oxidative stress, Nrf2, glutathione, age-related changes

The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** the study has been funded by the Noah's Ark project by Lomonosov Moscow State University.

**For citation:** Shilovsky GA, Putyatina TS, Orlovsky IV. Prospects for the development and application of antioxidant drugs based on glutamyl and metal-binding peptides. *Clin. Gerontol*. 2021; 27 (1-2): 59-63. <https://doi.org/10.26347/1607-2499202101-02059-063>

Ионы металлов необходимы для функционирования более трети всех белков живой клетки и участвуют в ряде ключевых биологических процессов, включая дыхание. В клетке ионы металлов присутствуют в виде обширного ряда комп-

лексных соединений как с лигандами неорганической природы (вода), так и с биомолекулами в качестве лигандов. Комплексы металлов с макромолекулами (белками, ДНК и РНК), где ионы металла могут играть как структурную, так и

Г.А. ШИЛОВСКИЙ<sup>1</sup>,  
Т.С. ПУТЯТИНА<sup>1</sup>,  
И.В. ОРЛОВСКИЙ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Российская Федерация, Москва

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Российская Федерация, Москва

Gregory Shilovsky<sup>1</sup>,  
Tatyana Putyatina<sup>1</sup>,  
Igor Orlovsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Department, Lomonosov Moscow State University

<sup>2</sup> Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University

функциональную роль (металлоферменты), чрезвычайно трудно поддаются изучению вследствие больших размеров и множества возможных взаимодействий «лиганда» и иона. Взаимодействие же малых молекул, присутствующих в клетке (нуклеозидов, нуклеотидов, аминокислот, пептидов и др.), с ионами металлов не только представляет самостоятельный интерес, с точки зрения координационной химии, но и весьма важно для установления дискретных взаимодействий металл-лиганд с перспективой использования полученных структурных данных, например для моделирования комплексов с макромолекулами и для решения функциональных задач в бионеорганической химии. Известен, например, ряд комплексов металлов с пептидами, проявляющих ферментативные свойства (супероксиддисмутазные, фосфодиэстеразные). Именно поэтому изучение координации малых молекул как *in vivo*, так и *in vitro* имеет не только фундаментальное значение, но и в перспективе может стать основой дизайна направленно действующих лигандов при решении разнообразных прикладных задач, прежде всего для разработки терапевтических препаратов против широкого круга заболеваний и патологических состояний (инфекционные, наследственные, ассоциированные со старением).

Как избыток металлов, так и их дефицит может вызвать метаболические дефекты, остановку клеточного цикла и гибель клеток, что приводит к тяжелым патологиям [1]. Некоторые возрастные протеотоксические заболевания (болезнь Паркинсона, марганезм и атаксия Фридрейха и др.) сопровождаются нарушением гомеостаза таких металлов (металлостаза), как железо, медь и цинк [2].

Содержание клеточных металлов регулируется сложными сетями транспортных белков, белков, связывающих металлы, и механизмами реакции на стресс [3]. Многие связанные с возрастом хронические заболевания частично возникают в результате нарушения или отказа этих регуляторных механизмов [4].

Конститутивное образование биоактивных пептидов в организме происходит при действии различных протеаз на клеточные белки [5]. У мышей, дефицитных по некоторым протеазам, наблюдается ускоренное старение [6]. Возрастные дегенеративные заболевания (атеросклероз, артрит, болезнь Альцгеймера) частично связывают с

нарушением экспрессии и активности протеаз и сдвигом пептидного профиля [7,8].

Короткие и малые пептиды, рассматриваемые как потенциальные биорегуляторы, представляют интерес в качестве лигандов именно с точки зрения природного в своей основе происхождения и «биосовместимости» с живыми системами.

Важную роль для жизнеспособности клетки играет контроль метаболизма и процессов развития, в значительной степени осуществляемый за счет тиол-дисульфидного обмена. SH-группы остатков цистеина весьма значимы для функционирования ферментов и процессов, лежащих в основе ответов на факторы окружающей среды и внутриклеточной передачи информации – клеточного сигналинга. Способность тиольных групп обратимо изменять свое редокс-состояние с последующим изменением конформационных, каталитических и регуляторных функций белка является базовым механизмом центральной роли тиол-опосредованного окислительно-восстановительного контроля в клеточном метаболизме [9]. Основой указанного контроля редокс-состояния тиольных групп белков является соотношение концентраций восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. В клетке глутатион присутствует в основном в форме GSH, содержание же окисленной формы (GSSG) составляет около 1%. Глутатион – самое распространенное низкомолекулярное соединение, его внутриклеточная концентрация достигает 10 мМ (гепатоциты, опухолевые клетки некоторых типов). Кроме антиоксидантных функций, GSH участвует в работе системы детоксификации, а также в регуляции механизмов клеточного сигналинга (регуляция клеточного цикла, экспрессия генов, апоптоз) [10]. Оптимальное соотношение концентраций GSH/GSSG является необходимым условием нормального функционирования клетки. Установлено, что нарушения регуляторных систем с участием глутатиона отмечаются при ряде онкологических и нейродегенеративных заболеваний, а также при муковисцидозе, СПИДе [11]. Недостаток глутатиона повышает риск окислительного повреждения внутриклеточных систем.

Оксидативным стрессом принято считать дисбаланс между образованием свободных радикалов и их удалением системой антиоксидантной защиты. Неконтролируемое образование активных форм кислорода за счет протекания реакции

Фентона с образованием гидроксильного радикала может быть в том числе следствием нарушения металлостаза [12]. Сложные системы транспорта, хранения и детоксификации металлов не только контролируют содержание катионов в клетке, но и вовлечены в механизмы ответной реакции на оксидативный стресс [3]. Причиной возникновения оксидативного стресса могут быть не только редокс-активные ионы железа, меди, марганца, но и некоторые редокс-инертные катионы. Полагают, что ионы кадмия и даже редокс-активной ртути нарушают систему антиоксидантной защиты, связывая тиольные группы цистеина в системных белках и в глутатионе (GSH) [12]. Последний непосредственно инактивирует активные формы кислорода (АФК) в клетке, причем две молекулы восстановленного глутатиона (GSH), каждая из которых отдает электрон, образуют окисленный глутатион (GSSG), содержащий дисульфидный мостик. Следует отметить, что редокс-инертный ион цинка, связываясь с рядом системных белков, является важным компонентом системы защиты от оксидативного стресса.

Интересно, что тот же самый механизм связывания тиольных групп цистеина может иметь и положительный эффект – усиление антиоксидантной защиты. Ядерный фактор, сходный с эритроидным фактором 2 (Nrf2), является транскрипционным фактором, который регулирует транскрипцию защитных генов в ответ на клеточные окислительные и электрофильные стрессы, являясь самым мощным регулятором антиоксидантной защиты клетки [13]. В бесстрессовых базальных условиях Nrf2 образует комплекс с Kelch-подобным ECH-ассоциированным белком (Keap1), который ингибирует транслокацию Nrf2 в ядро и ведет его к убиквитинированию и протеолитической деградации [13]. Нарушения функционирования Nrf2 при окислительном или электрофильном стрессе вовлечены в патогенез различных заболеваний человека, и система Nrf2-Keap1 считается перспективной мишенью для лечения расстройств, связанных с окислительным и воспалительным стрессом, включая рак, воспаление, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания [14]. Nrf2 регулирует транскрипцию генов защитных белков, в том числе ответственных за синтез и метаболизм глутатиона, в ответ на окислительные и электрофильные стрессы и является самым мощным регулятором антиоксидантной защиты клетки [13].

Показано, что активность Nrf2 (а следовательно, и мощность антиоксидантной защиты клетки) повышается благодаря взаимодействию с Keap1 с рядом ионов. В частности, ионы  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и соединения Se (IV) и As (III) взаимодействуют с Keap1 через остатки цистеина C226 и C613 [14]. Нарушение белок-белковых взаимодействий за счет связывания тиольных групп цистеина ионами металлов в белке Keap1 препятствует образованию комплекса с Nrf2, ингибирующего транслокацию последнего в ядро и ведущего к убиквитинированию и протеолитической деградации Nrf2 [13]. Гомолог mKeap1b способен связывать ионы цинка и кадмия посредством минимального «цинкового сенсора» – триады аминокислотных остатков H225, C226 и C613 [14]. Остатки C226 и C613 в Keap1 также чувствительны к АФК, поскольку при воздействии перекиси водорода они могут образовывать временный внутримолекулярный дисульфидный мостик, который связан с краткой стабилизацией белка Nrf2 [16].

Для тех же целей предложен ряд пептидных ингибиторов на основе консенсусной последовательности ETGE (например, DEETGEF или DPETGEL) [17] и тетрапептид Ac-EWWW-OH, осуществляющий иное ингибирующее действие, нежели указанные выше пептиды [14]. Последовательности активирующих пептидов содержат остатки аспарагиновой (D) и глутаминовой (E) кислот, являющиеся потенциальными лигандами, координируемые ионами металлов. Изучение лигандных свойств указанных пептидов и близких к ним по структуре может стать основой для разработки таргетных терапевтических препаратов комбинированного действия.

В качестве модельной системы для изучения связывания металлами тиольной группы цистеина и боковой карбоксильной группы глутаминовой кислоты выбрали природный трипептид глутатион. Благодаря наличию в структуре глутатиона большого количества функциональных групп он способен связывать ионы металлов, что может иметь важное функциональное значение для клеточных процессов. Так, например, окисленный димер глутатиона контролирует содержание металлов в металлотионеинах – низкомолекулярных белках, выполняющих роль лигандов, хелатирующих тяжелые металлы. В то же время глутатион и его растительные олигомеры фитохелатины способны связывать ионы таких металлов, как таллий, ртуть, олово, свинец, кад-

мий, являющиеся весьма опасными продуктами промышленной деятельности.

Для оценки роли остатка  $\gamma$ -глутаминовой кислоты в структуре глутатиона изучали координационные свойства ряда его синтетических аналогов при образовании комплексов с ионами металлов. Жесткие ионы металлов вступают во взаимодействие в основном с остатком глутаминовой кислоты, тогда как мягкие ионы предпочитают координировать тиольную группу [18].

Показано, что взаимодействия глутатиона и его синтетических аналогов с никелем имеют более выраженный и однозначный характер, чем с цинком; константы устойчивости комплексов никеля в целом выше [19]. Никель, хотя и входит в состав некоторых металлоферментов (никелевая супероксиддисмутаза), не является истинным биогенным металлом, но может служить удобным модельным ионом для изучения координации пептидных лигандов, в том числе при разработке терапевтических препаратов на их основе. Учитывая уникальные физиологические функции глутатиона, изучение координационных свойств как самого глутатиона, так и подобных пептидов, может представлять значительный интерес для токсикологии и регуляции клеточных окислительно-восстановительных процессов.

В настоящее время в условиях пандемии COVID-19 особенно актуален вопрос разработки терапевтических препаратов, направленных против острых состояний и заболеваний, сопутствующих вирусной инфекции. Например, высказано предложение использовать известные активаторы системы Nrf2-Keap1, включая известные препараты сульфорафан, дитиосульфат натрия и диметилфумарат (Текфидера) для купирования гиперцитокинемии [20]. С другой стороны, описаны случаи успешного применения глутатиона для облегчения респираторных симптомов при пневмонии, вызванной COVID-19 [21]. Причем, как уже упоминалось ранее, системы энзиматического синтеза глутатиона контролируются фактором Nrf2. Таким образом, логично предположить, что металлопептиды с рядом катионов (цинк, кадмий) и глутатионом и его синтетическими аналогами в качестве лигандов могут стать перспективной основой при разработке таргетных препаратов второго поколения, направленных на активацию фактора транскрипции Nrf2 для комбинированной терапии ряда заболеваний. В соответствии со всем вышесказанным представля-

ется логичным рассматривать уже известные активаторы фактора Nrf2 в качестве препаратов первого поколения. Металлопептиды с рядом катионов (цинк, кадмий), глутатионом и его синтетическими аналогами и пептидами на основе консенсусной последовательности ETGE в качестве лигандов могут стать перспективной основой при разработке таргетных препаратов второго поколения, селективно направленных на активацию фактора транскрипции Nrf2 для комбинированной терапии ряда заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bull PC, Cox DW. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* 1994; 10 (7): 246–252. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90172-4)
2. Klang IM, Schilling B, Sorensen DJ, Sahu AK, Kapahi P, Andersen JK, Swoboda P, Killilea DW, Gibson BW, Lithgow GJ. Iron promotes protein insolubility and aging in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6 (11): 975–991. <https://doi.org/10.18632/aging.100689>
3. Martinez-Finley EJ, Chakraborty S, Fretham SJ, Aschner M. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals. *Metallomics*. 2012; 4 (7): 593–605. <https://doi.org/10.1039/c2mt00185c>
4. Farina M, Avila DS, da Rocha JB, Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. 2013; 62 (5): 575–594. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>
5. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4 (7): 544–558. <https://doi.org/10.1038/nrg1111>
6. Varela I, Cadiñanos J, Pendás AM, Gutiérrez-Fernández A, Folgueras AR, Sánchez LM, Zhou Z, Rodríguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, López-Otín C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signaling activation. *Nature*. 2005; 437 (7058): 564–568. <https://doi.org/10.1038/nature04019>
7. Dollyer CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovascular Research*. 2006; 69 (3): 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.11.003>
8. Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008; 4 (3): 128–135. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0727>
9. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. *Успехи биологической химии*. 2014. 54. С. 299–348. Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. [The role of glutathione, glutathione transferase and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes]. *Advances in Biological Chemistry*. 2014; 54: 299–348. Russian.
10. Janssen-Heininger YM, Nolin JD, Hoffman SM, van der Velden JL, Tully JE, Lahue KG, Abdalla ST, Chapman DG, Reynaert NL, van der Vliet A, Anathy V. Emerging mechanisms of glutathione dependent chemistry in biology and disease. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013; 114 (9): 1962–1968. <https://doi.org/10.1002/jcb.24551>

11. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003; 57: 145–155.
12. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*. 2016; 90 (1): 1–37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>
13. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Research*. 2001; 61 (8): 3299–3307.
14. Sogabe S, Sakamoto K, Kamada Y, Kadotani A, Fukuda Y, Sakamoto JI. Discovery of a Kelch-like ECH-associated protein 1-inhibitory tetrapeptide and its structural characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 486 (3): 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.038>
15. McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 2010; 107: 18838–18843.
16. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of Nrf2 by nitrosative agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves Keap1 disulfide formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (11): 8463–8471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051714>
17. Hancock R, Schaap M, Pfister H, Wells G. Peptide inhibitors of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction with improved binding and cellular activity. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2013; 11 (21): 3553–3557. <https://doi.org/10.1039/c3ob40249e>
18. Krezel A, Bal W. Coordination chemistry of glutathione. *Acta Biochimica Polonica*. 1999; 46 (3): 567–580.
19. Litunov A, Doljenko V, Prusov A, Orlov V, Sumbatian N, Orlovsky I. Glutathione synthetic analogs coordination by some metal ions. 2019. *Physical Methods to study metals in Biology: from in vitro to in cell studies* (METBIO 2), FrenchBIC CNRS, Marseille.
20. Zinovkin RA, Grebenchikov OA. Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients. *Biochemistry (Moscow)*. 2020; 85 (7): 833–837. <https://doi.org/10.1134/s0006297920070111>
21. Horowitz RI, Freeman PR, Bruzzese J. Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: a report of 2 cases. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2020; 30: 101063. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101063>

Поступила 12.11.2020

Принята к опубликованию 21.12.2020

Received 12.11.2020

Accepted 21.12.2020

### Сведения об авторах

Шиловский Григорий Александрович – научный сотрудник Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Тел.: 8 (495) 939-27-48. E-mail: gregory\_sh@list.ru.

Путяткина Татьяна Сергеевна – старший научный сотрудник Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Тел.: 8 (495) 939-39-01. E-mail: tsergput@gmail.com.

Орловский Игорь Вячеславович – научный сотрудник отдела молекулярных основ онтогенеза, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ МГУ. Тел.: 8 (495) 939-54-12. E-mail: igor.orlovsky@belozersky.msu.ru.

### About the authors:

Gregory A. Shilovsky – Research Fellow, Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow. E-mail: gregory\_sh@list.ru

Tatyana S. Putyatina – Senior Research Fellow, Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow. E-mail: tsergput@gmail.com

Igor V. Orlovsky – Research Fellow, Molecular Bases of the Ontogenesis Department, Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow. E-mail: igor.orlovsky@belozersky.msu.ru

### Личное участие авторов

Шиловский Г.А. (биолог, специалист по системной биологии старения, поиск актуальных направлений в биogerонтологии): Поиск актуальных направлений в биogerонтологии, написание и оформление текста статьи, идентификация мишени-Nrf2, сбор материалов и описание его свойств, структур и приложений, координатор группы.

Путяткина Т.С. (биолог, эволюционист-бионформатик): характеристика и сравнение свойств исследуемых белков и их функциональных доменов у человека и объектов доклинических испытаний, включая лабораторных животных и клеточные культуры. Работа с базами данных Pubmed, Genbank, Ensembl.

Орловский И.В. Химик, молекулярный биолог, специалист в области бионеорганической химии; синтез, свойства и биологические приложения координационных соединений с природными лигандами (аминокислоты, пептиды, нуклеотиды и др.). Анализ и обобщение материала, разработка и описание концепции возможного применения металлпептидов в качестве предшественников активаторов 2-го поколения. Все авторы участвовали в написании и обсуждении текста и во внесении правок в ответ на вопросы рецензентов.