

SIGNIFICANCE OF THIOL-DISULFIDE BALANCE IN SARS-CoV-2 INFECTION

ZNAČAJ TIOL-DISULFIDNE RAVNOTEŽE U SARS-CoV-2 INFEKCIJI

Tatjana Simić¹

¹Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Beograd, Srbija

Correspondence: tatjana.simic@med.bg.ac.rs

Abstract

Studies of the molecular mechanisms regarding interaction of different viruses with receptors on the host cell surface have shown that the viral entry depends on the specific relationship between free thiol (SH) groups and disulfides on the virus surface, as well as the thiol disulfide balance on the host cell surface. The presence of oxidizing compounds or alkylating agents, which disturb the thiol-disulfide balance on the surface of the virus, can also affect its infectious potential. Disturbed thiol-disulfide balance may also influence protein-protein interactions between SARS-CoV-2 protein S and ACE2 receptors of the host cell. This review presents the basic mechanisms of maintaining intracellular and extracellular thiol disulfide balance and previous experimental and clinical evidence in favor of impaired balance in SARS-CoV-2 infection. Besides, the results of the clinical application or experimental analysis of compounds that induce changes in the thiol disulfide balance towards reduction of disulfide bridges in proteins of interest in COVID-19 infection are presented.

Keywords:

thiol-disulfide balance,
COVID-19

Sažetak

Istraživanja molekularnih mehanizama interakcije različitih virusa sa receptorima na površini ćelija domaćina pokazala su da ulazak virusa zavisi od specifičnog odnosa između slobodnih tiol (SH) grupa i disulfida na površini virusa, kao i od tiol-disulfidne ravnoteže na površini ćelija. Prisustvo oksidišućih jedinjenja ili alkilirajućih agensa, koja remete tiol-disulfidnu ravnotežu na površini virusa, može uticati i na njihov infektivni potencijal. Poremećena tiol-disulfidna ravnoteža može uticati i na protein-proteinske interakcije između SARS-CoV-2 proteina S i ACE2 receptora ćelije domaćina. U ovom radu su prikazani osnovni mehanizmi održavanja intracelularne i ekstracelularne tiol-disulfidne ravnoteže i dosadašnji eksperimentalni i klinički dokazi koji idu u prilog poremećaju ove ravnoteže u SARS-CoV-2 infekciji. Pored toga, predstavljeni su dosadašnji rezultati kliničke primene ili eksperimentalne analize jedinjenja koja dovode do promene tiol-disulfidne ravnoteže u pravcu redukcije disulfidnih mostova proteina od interesa u COVID-19 infekciji.

Ključne reči:

tiol-disulfidna ravnoteža, COVID-19

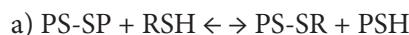
Značaj tiol-disulfidne ravnoteže u SARS-CoV-2 infekciji

Istraživanja molekularnih mehanizama interakcije različitih virusa sa receptorima na površini ćelija domaćina pokazala su da ulazak virusa može zavisi od specifičnog odnosa između slobodnih tiol (SH) grupa i disulfida na površini virusa, kao i tiol-disulfidne ravnoteže na površini ćelija domaćina (1). Prisustvo oksidišućih jedinjenja ili alkilirajućih agensa, koja remete tiol-disulfidnu ravnotežu na površini virusa, može uticati i na njihov infektivni potencijal (2). Naime, prooksidantno okruženje favorizuje interakciju između virusa i njegovog receptora na ćeliji domaćina, bez obzira na kaskadu događaja nakon aktivacije receptora, predstavljajući tako očuvan i efikasan mehanizam, zajednički za različite vrste virusnih infekcija. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da poremećena tiol-disulfidna ravnoteža može uticati i na protein-proteinske interakcije između SARS-CoV-2 proteina S i ACE2 receptora ćelije domaćina (3). Veruje se da teži klinički ishod ove infekcije kod starijih osoba, između ostalog, nastaje i zbog opšteg poremećaja redoksa homeostaze, koji ometa procese oporavka i regeneracije tkiva, povećavajući rizik od virusnih infekcija. Naime, u toku starenja dolazi do smanjenja efikasnosti homeostaznih sistema koji kontrolišu redoks ravnotežu svih tkiva, uključujući i pluća, što može objasniti povećanu osetljivost na infekcije i češći razvoj oštećenja pluća usled neadekvatne regulacije zapaljenjskog procesa i fibroze (4). Inspiracija za ovaj pregledni članak je nedavni revijski rad istraživačke grupe koja je među prvima prepoznala i opisala značaj poremećene tiol-disulfidne ravnoteže u COVID-19, a čiji je član Frančesko Gali, profesor na Medicinskom fakultetu u Perudi i gostujući profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu (4).

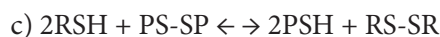
Tiol disulfidna ravnoteža: razlike između ćelija i vanćelijskog prostora

Da bi se razumeo način na koji dolazi do interakcije proteina uključenih u redoks homeostazu u COVID-19 infekciji, neophodno je upoznati se sa ekstracelularnim sistemima koji održavaju ravnotežu između redukovanih i oksidovanih cisteina u molekulima proteina. Ključni faktor

koji utiče na stanje oksidacije unutarlančanih cisteina u proteinima je koncentracija i redoks status tiol jedinjenja male molekulske mase (engl. *low molecular weight thiols*, LMW) (5). Ova jedinjenja su ključna u redoks puferovanju proteinskih cisteina i direktno učestvuju u reakcijama tiol-disulfidne izmene. Naime, tiol jedinjenja male molekulske mase reaguju sa cisteinima u proteinima nukleofilnim napadom na postojeće disulfidne veze (6) prema sledećoj reakcionoj shemi:



što rezultira:



gde RSH predstavlja tiol jedinjenje male molekulske mase (LMW-SH), PSH je proteinska -SH grupa, PSSP su inter- (ili intra-) lančani proteinski disulfidi i PS-SR su mešoviti disulfidi nastali između proteina i tiola male molekulske mase. Tiolatne forme ovih jedinjenja su stvarni reagujući oblici u ovim reakcijama i porast ili smanjenje količine RSH ili RS-SR pomera ravnotežu reakcije (c) prema desno ili levo (6).

U sastav tiol jedinjenja male molekulske mase i njihovih odgovarajućih disulfida u vanćelijskim tečnostima ulaze, kao najzastupljeniji, redoks-aktivni parovi: cistein/cistin (Cis/CiSS), cisteinilglicin/cistinilglicin (CisGli/CisGliSS) i glutation/glutation disulfid (GSH/GSSG). U plazmi čoveka prosečni odnos za ove parove je 0,2, a prosečne koncentracije ukupnog cisteina i glutationa su ~ 200 mM, odnosno < 10 mM (7). Nasuprot tiol-disulfidnoj ravnoteži, koja je u vanćelijskim uslovima pomerena ka oksidovanim formama tiol jedinjenja male molekulske mase, intracelularno, daleko najvažnije niskomolekulsko tiol jedinjenje je glutation, sa koncentracijama u rasponu od 1 do 10mM, u zavisnosti od tipa ćelija (8). Odnos GSH/GSSG kreće se između 200 i 800 (9). Na ovaj odnos mogu da utiču vanćelijski tioli i disulfidi. Koncentracija cisteina i drugih niskomolekularnih tiol jedinjenja je u ćelijama mikromolarna, pri čemu je koncentracija redukovanih oblika

takođe dominantna u odnosu na oksidovane forme (10). Razlike u odnosu redukovanih prema oksidovanim formama tiola male molekulske mase ukazuju na to da ćelije održavaju izrazito redukovane uslove sredine, dok u ekstracelularnom okruženju preovlađuju oksidovane forme. Delovanje alkilirajućih agensa ili reaktivnih vrsta kiseonika utiče na metabolizam unutarćelijskih tiola male molekulske mase, uzrokujući njihovu oksidaciju, što se odražava i na promene u odnosu redukovanih i oksidovanih tiola u ekstracelularnom prostoru. Promene tiol-disulfidne ravnoteže specifične su za određeni tip ćelija i određena oboljenja (11). Unutarćelijski i vanćelijski nivoi cisteina i GSH regulisani su dvosmernim transportnim sistemima; neto priliv cisteina i cistina obezbeđuje ćelije cisteinom potrebnim za biosintezu GSH, dok izlazak cisteina, GSH i drugih tiola male molekulske mase iz ćelija dovodi do redistribucije jedinjenja koja sadrže sumpor u ekstracelularnom prostoru, obezbeđujući njihovu dostupnost za druge ćelije i međuorganski transport cisteina i GSH. U uslovima oksidativnog ili elektrofilnog stresa ćelija eksprimira se baterija gena za adaptivni odgovor na stres, radi kontrole protoka ovih jedinjenja i održavanja redoks homeostaze. U ovim uslovima geni za katalitičke i regulatorne proteine, uključene u antioksidantnu zaštitu, kompenzatorno utiču na pojačanu sintezu i redukciju glutaciona, a time i adaptivno na sastav ekstraćelijskih tiol jedinjenja male molekulske mase (10). Ovaj proces je izraz metaboličke i homeostazne sposobnosti tkiva da reaguje na redoks distres, koji se sa godinama smanjuje, povećavajući rizik kako od hroničnih nezaznih oboljenja udruženih sa oksidativnim stresom (12), tako i od virusnih infekcija (13).

Redukcione ekvivalente (u formi *NADPH*), neophodne za aktivnost glutation reduktaze (GR), ključnog enzima za regeneraciju glutaciona, obezbeđuje metabolička aktivnost pentozofosfatnog puta u ćelijama. Glutation reduktaza zajedno sa drugim oksidoreduktazama, kao što je npr. tioredoksin reduktaza, održava unutarćelijski nivo tiola male molekulske mase u redukovanom obliku (11):

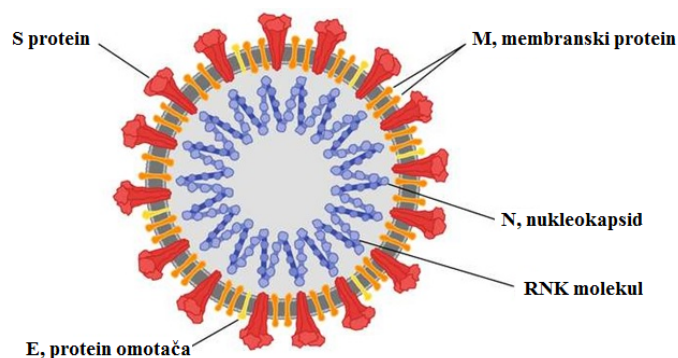
$$\text{GSSG} + 2\text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + 2\text{NADP} + 2\text{H}^+ \text{ (katalisana glutation reduktazom)}$$

Kao rezultat ovog redukovanog okruženja, intracelularno, u proteinima je prisutno manje od 10% cisteina u obliku disulfida (14). Nasuprot tome, u ekstracelularnoj sredini nedostaju efikasni sistemi redoks homeostaze. U plazmi je zabeleženo prisustvo *NADPH* i glutation reduktaze u tragovima, mada se ne može isključiti da potiču od nespecifičnog oslobađanja unutarćelijskog sadržaja tokom vađenja krvi i obrade uzorka. Pored toga, u plazmi su prisutni i drugi enzimski antioksidantni sistemi, poput superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze (15), koji indirektno, redukcijom reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, pomažu održavanje redoks ravnoteže. Izgleda da sistem tioredoksin reduktaze, koji igra glavnu ulogu u kontroli redoks stanja proteinskih cisteina u ćelijama, ne utiče na redoks procese u vanćelijskim tečnostima (16). Svi ovi aspekti čine ukrštanje proteina putem disulfidnih mostova

verovatnijim u vanćelijskim uslovima nego unutar ćelija. Tako je, na primer, pokazano da albumini stvaraju mešovite disulfide sa tiolima male molekulske mase na poziciji cisteina 34. Pored ovog, jedinog cisteina, koji je eksprimiran na površini albumina, albumin sadrži i 17 disulfidnih mostova koji su smešteni duboko u unutrašnjosti molekula. Više od 80% homocisteina u plazmi vezano je za albumine, a i cistein, glavni vanćelijski tiol, formira mešane disulfide sa albuminima i drugim ekstracelularnim tiolima male molekulske mase (17). Interesantno je da cistein na poziciji 34 albumina ne može da formira disulfide sa drugim molekulima albumina ili drugim proteinima jer se nalazi u delimično zaštićenoj pukotini koja sterno sprečava reaktivnost cisteina sa drugim proteinima (18). Tiol-disulfidna ravnoteža reguliše vezivanje albumina za ćelijske receptore (15), a kao što je pomenuto, isti redoks mehanizam je uključen u interakciju koronavirusa sa ćelijama domaćina, uključujući i interakciju SARS-CoV-2 sa ACE2 receptorima u plućnom epitelu.

S-protein SARS-CoV-2 virusa i ACE2 receptor su redoks senzitivni proteini

Koronavirus sadrži četiri glavne vrste strukturnih proteina, uključujući S protein, proteine membrane, omotača i nukleokapsida (**slika 1**).

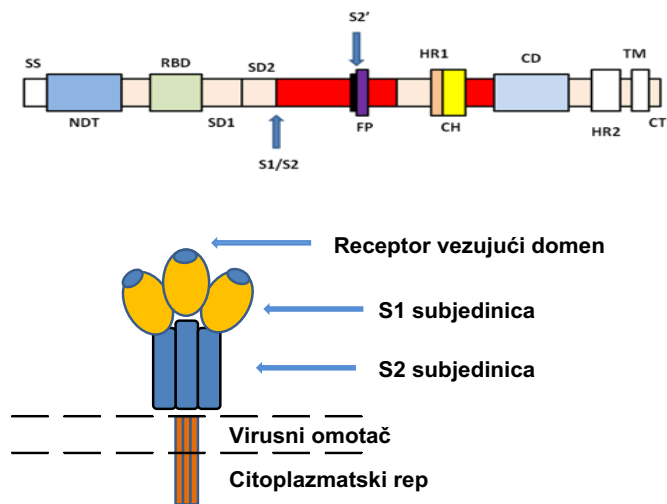


Slika 1. Prilagođeno po *Britannica, The Editors of Encyclopedia. "Coronavirus". Encyclopedia Britannica, 2021, <https://www.britannica.com/science/coronavirus-virus-group>.*

Protein S (engl. *spike protein*) se nalazi na površini virusa u obliku trimera, a svaki monomer se sastoji od dve subjedinice, označene kao S1 i S2 (**slika 2**). U okviru S1 subjedinice se nalaze N-terminalni domen i domen koji veže receptor (engl. *receptor binding domen*, RBD), koji je odgovoran za interakciju sa receptorskim proteinima ćelija domaćina. Subjedinica S2 sadrži fuzioni peptid, heptapeptidni ponovak 1, heptapeptidni ponovak 2, transmembranski (TM) i citoplazmatski domen. Kada se S protein veže za receptor, TM serinska proteaza 2, lokalizovana na površini ćelije domaćina aktivira S protein, dovodeći do njegovog cepanja i fuzije.

U strukturi SARS-CoV-2 S1 subjedinice prisutna su četiri disulfidna mosta na položajima C391–C525; C336–C361; C379–C432 i C480–C488, koji su podložni redukciji ili reakcijama izmene sa tiolima male molekulske

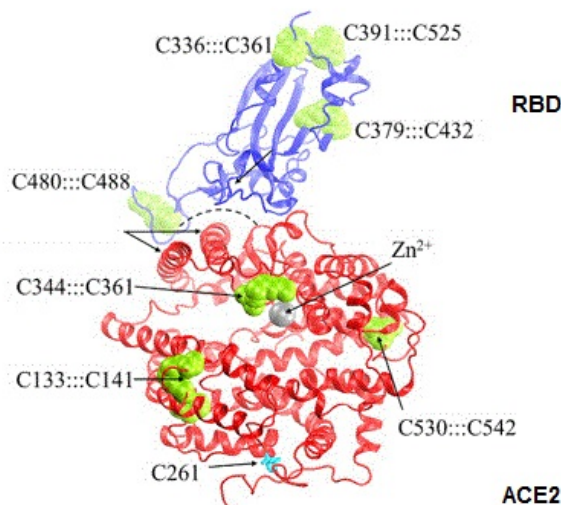
mase. Odnedavno se pažnja poklanja i disulfidnom mostu između C822 i C833, koji je smešten u subjedinici S2, odnosno domenu SARS-CoV-2 virusa koji je uključen u fuziju virusa sa membranom. U strukturi ACE2 receptora su prisutna tri disulfidna mosta (C344–C361; C133–C141; C530–C542). Pored toga, ACE2 receptor poseduje i jedan redukovani ostatak cisteina na položaju 261.



Slika 2. Struktura gena za S protein SARS-CoV-2 (a) i homotrimer S proteina (b); SS (engl. *single sequence*); NTD - N-terminalni domen; RBD - engl. *receptor-binding domain*, receptor vezujući domen; SD1 - subdomen 1; SD2 - subdomen 2; S1/S2, S1/S2 mesto isecanja; S2' - S2' mesto isecanja; FP - fuzioni peptid; HR1 - heptadni ponovak 1; CH - centralni heliks; CD - domen konektora; HR2 - heptadni ponovak 2; TM - transmembranski domen; CT - citoplazmatski rep.

Molekularno dinamičke studije su ukazale da smanjen broj disulfidnih mostova u ACE2 i domenu virusa koji veže receptor može uticati na afinitet za vezivanje SARS-CoV-2 (3) (**slika 3**). Konkretno, cepanje disulfidnog mosta C344–C361 ACE2 utiče na konformacionu promenu dva alfa heliksa koji se prostorno uklapaju u udubljenu obliku petlje SARS-CoV-2 domena koji vezuje receptor (**slika 3**). Isto tako, redukcija C480–C488 disulfidne veze u RBD domenu S1 subjedinice SARS-CoV-2 modifikuje strukturni motiv petlje koji čine β lanci ovog domena (**slika 3**). Studije simulacije su pokazale da redukcija disulfidnih veza na S proteinu SARS-CoV-2 i ACE2 ima sinergistički efekat koji dovodi do smanjenog afiniteta i vezivanja ovih proteina (3). Trenutno u literaturi ne postoje informacije o mogućim efektima oksidacije cisteina na položaju C261 ACE2 receptora (4). Čak i ako se pretpostavi da ovaj cisteinski ostatak ne može da formira intramolekularne disulfide, nije isključeno da tokom oksidacije može doći do stvaranja mešovityh disulfida sa tiolima male molekulske mase iz ekstracelularnog okruženja, usled čega može doći do modifikacije konformacije receptora i alosternih efekata, kao što je pokazano za nekoliko proteina koji su uključeni u interakciju između virusa i ćelija (2). Imajući u vidu značajnu ulogu disulfidnih mostova u strukturi S proteina SARS-CoV-2 i ACE2 receptora, moguće je pretpostaviti da afinitet vezivanja S-proteina i ACE2 receptora

zavisi od tiol-disulfidne ravnoteže ekstracelularnog okruženja u kome se ova interakcija odvija. U tom smislu, posebno je važna tiol-disulfidna ravnoteža u plućima, za koja se veruje da su glavno mesto ulaska SARS-CoV-2 virusa u ljudski organizam.

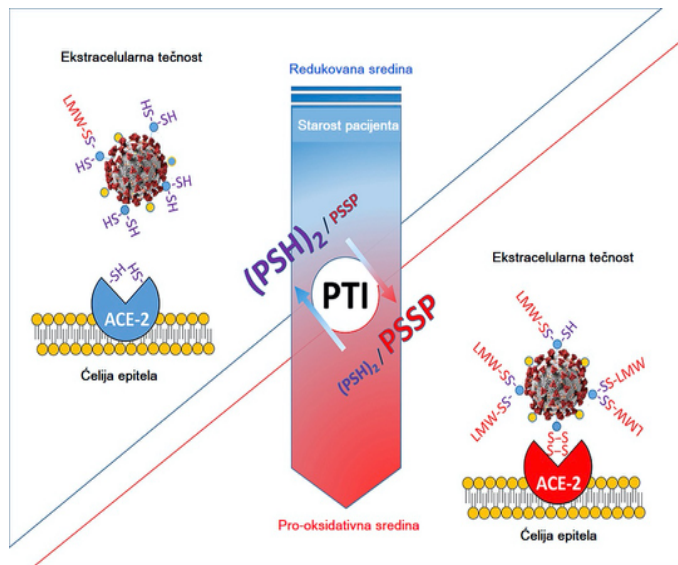


Slika 3. Prilagođeno po *Impact of Thiol–Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor of Hati et al (3)*; Copyright © 2020 American Chemical Society; RBD - engl. *receptor-binding domain*, receptor vezujući domen; ACE2 - engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, angiotenzin konvertujući enzim.

Važno je istaći da su pluća izložena visokom parcijalnom pritisku kiseonika i zato ne iznenađuje da tiol jedinjenja pružaju važnu prvu liniju odbrane od ovog prooksidantnog okruženja. Naime, plućno tkivo je glavno skladište glutaciona čije koncentracije se kreću u opsegu od 6,1 do 17,5 nmol/mg tkiva (19). Koncentracija glutaciona u tečnosti koja oblaže alveole je od 100 do 400 mM (20), što je daleko više (od 10 do 100 puta) u odnosu na vrednosti pronađene u krvnoj plazmi (< 10 mM, obično između 1 i 6 mM). Štaviše, u najranijoj fazi hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) sadržaj glutaciona se povećava, što ukazuje na prisustvo adaptivnog odgovora pluća na faktore okruženja (npr. duvanski dim) i prooksidativne efekte zapaljenja (21). Takav odgovor je presudan za antioksidativnu zaštitu plućnog tkiva, ali nažalost, njegova efikasnost opada sa godinama.

Tiol jedinjenja male molekulske mase učestvuju u stvaranju mešovityh disulfida sa proteinima koji se nalaze u tečnosti koja oblaže alveole, pri čemu dolazi do promene njihove strukture i funkcije. Za razliku od procesa tiolacije proteina u epitelnim ćelijama pluća, koji se odvija kao proces S-glutationilacije, spontano i pomoću specifičnih enzimskih reakcija (22), vanćelijska S-tiolacija se spontano dešava samo u prisustvu nukleofilnih tiol jedinjenja male molekulske mase, slično kao u plazmi (23). Gali i saradnici su nedavno pretpostavili da cistein, prisutan u proteinima tečnosti koja oblaže alveole, kao i epitopi receptora epitelnih ćelija pluća, uključujući i ACE2 receptor, mogu učestvovati u reakcijama

tiol-disulfidne izmene sa tiol jedinjenjima male molekulske mase (4).



Slika 4. Prilagođeno po *The Age-Dependent Decline of The Extracellular Thiol-Disulfide Balance and Its Role in SARS-CoV-2 infection* od Daniela Giustarini et al (4); Copyright © 2021 Published by Elsevier B.V. under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PTI - engl. *Protein Thiolation Index*; PSH - proteinske-SH grupe; PSSP - intramolekularni ili intermolekularni disulfidi; LMW - engl. *low molecular weight thiols*, tiol jedinjenja male molekulske mase; ACE2 - engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, angiotenzin konvertujući enzim.

Stepen tiolacije proteina u alveolarnoj tečnosti i epitelnim ćelijama pluća zavisi od dostupnosti ovih jedinjenja i tiol-disulfidne ravnoteže u ovoj biološkoj tečnosti. Moguće je pretpostaviti da oksidovanije vanćelijsko okruženje pogoduje stvaranju intramolekularnih ili intermolekularnih disulfida (koji se nazivaju i mešoviti disulfidi) i da ovi redoks procesi direktno pogoduju interakciji SARS-CoV-2 sa ACE2 receptorom i ulasku virusa u ćelije.

Poremećaj tiol-disulfidne ravnoteže u SARS-CoV-2 infekciji

Hipoteza da kod bolesnika sa SARS-CoV-2 infekcijom postoji poremećaj tiol-disulfidne ravnoteže eksperimentalno je potvrđena u nekoliko studija. U prvoj publikaciji, koju je objavio ruski naučnik Polonikov, meren je sadržaj redukovanog glutationa kod četiri pacijenta, a najniže vrednosti su zabeležene kod pacijenta sa najtežom kliničkom slikom (24). Sveobuhvatnije istraživanje Kalem i sar. analiziralo je grupu od 144 pacijenta i sedamdeset zdravih osoba (25). Pokazano je da pacijenti sa težim oblicima COVID-19 imaju niže nivoe nativnih (redukovanih oblika) i ukupnih tiol grupa (redukovanih i oksidovanih) u poređenju sa zdravim osobama. Pored toga, pokazana je negativna korelacija između trajanja simptoma dispneje, kašlja, groznice i upale grla i sadržaja nativnih tiol jedinjenja. Nedavna

studija Erel i saradnika, izvedena na 517 bolesnika, potvrdila je pad koncentracije tiol jedinjenja u infekciji SARS-CoV-2 (26). Pad nivoa tiol grupa u plazmi tesno je povezan sa napredovanjem bolesti. Ovi rezultati su pokazali da bi nivo tiol grupa u plazmi mogao biti značajan prediktivni biomarker za nastanak teških oblika COVID-19.

Tiol-disulfidna ravnoteža kao terapijska meta u SARS-CoV-2 virusnoj infekciji

Uprkos činjenici da postoje podaci iz literature koji ukazuju da promene redoks statusa proteina bogatih cisteinom u SARS-CoV-2 otežavaju ulazak virusa u ćelije domaćina, retki su pokušaji primene tiol jedinjenja kao terapijske strategije u antivirusnom lečenju. Umesto toga, tiol jedinjenja su se najčešće u terapiji COVID-19 primenjivala zbog njihovog antioksidativnog ili antiinflamatornog efekta (27). Primena tiol jedinjenja predstavlja racionalan izbor iz klase lekova koji se mogu prenameniti za testiranje u kliničkim uslovima kod bolesnika obolelih od COVID-19. Činjenica da ovi lekovi sprečavaju ulazak virusa je posebno privlačna jer inhibitori ulaska sprečavaju infekciju ćelija i prekidaju aktivnu infekciju. Lekovi na bazi tiola se decenijama koriste za višestruke indikacije i dobro se podnose. U daljem tekstu će biti prikazani dosadašnji rezultati kliničke primene ili eksperimentalne analize jedinjenja koja dovode do promene tiol-disulfidne ravnoteže u pravcu redukcije disulfidnih mostova proteina od interesa u COVID-19 infekciji.

N-acetil-L-cistein (NAC) bio je među prvim tiol jedinjenjima koja su primenjena u COVID-19 infekciji. NAC je prekursor redukovanog glutationa (GSH). Zbog svoje podnošljivosti, ovaj plejotropni lek se koristi ne samo kao mukolitik već i kod poremećaja u kojima postoji oksidativni stres. U vrlo visokim dozama NAC se daje kao antidot prilikom trovanja paracetamolom. Pretpostavljeno je da će NAC, zbog svog uticaja na tiol-disulfidnu ravnotežu, imati inhibitorni efekat na interakciju između domena SARS-CoV-2 koji veže receptor i ACE2. Pored NAC, pretpostavljeno je i da suplementacija L-cisteinom može imati povoljan efekat na metabolizam vitamina D i aktivaciju receptora za vitamin D (28). Međutim, podaci iz literature o primeni NAC su kontradiktorni. Tako je Oksfordska COVID-19 grupa već u aprilu 2020, na osnovu uvida u tada raspoložive podatke, zaključila da nema dokaza da primena NAC ima specifične povoljne efekte u COVID-19 (29). Međutim, ovaj stav se razlikuje od nekoliko kasnijih publikacija koje idu u prilog primeni NAC u prevenciji i lečenju bolesnika sa COVID-19, a koje su prikazane u preglednom radu De Flore i saradnika (30). Ovi autori zaključuju da oralna primena NAC verovatno umanjuje rizik od razvoja COVID-19. Pored toga, može se očekivati da intravenska primena NAC u visokim dozama deluje kao pomoćno sredstvo u lečenju teških slučajeva COVID-19 i u kontroli nastanka smrtonosnih komplikacija. Pored NAC, sugerisana je i primena β -merkaptetanola kao redukujućeg agensa. Veruje se da bi primena β -merkaptetanola bila bolji izbor tiola od NAC jer je snažniji, takođe ima plejotropne efekte, koristi se u do 100 puta nižim dozama, reciklira se bez

modifikacije ili biološke ugradnje i nema neke od neželjenih efekata NAC (31).

Značaj disulfidnih mostova u strukturi S proteina i potencijal da budu terapijske mete u COVID-19 nedavno su sveobuhvatno ispitivali Manček-Keber i saradnici (32). Naime, ova grupa istraživača je testirala efekat nekoliko redoks aktivnih jedinjenja, uključujući N-acetil-cistein-amid, L-askorbinsku kiselinu, auranofin i JTT-705 (inhibitor holosteril estar transfer proteina), za koja su pretpostavili da mogu raskinuti disulfidne veze u domenu S proteina koji veže receptor. Korišćena je specifična metoda protočne citometrije kojom je bilo moguće odvojeno analizirati vezivanje receptor vezujućeg domena za ACE2 i fuziju virusa sa ćelijom. Pokazano je da ova jedinjenja sprečavaju stvaranje sincicijuma, ulazak virusa u ćelije i infekciju na mišjem animalnom modelu. NAC, L-askorbinska kiselina i JTT-705 su na molekularnom nivou uticali kako na vezivanje RBD i ACE2, tako i na fuziju virusa sa ćelijom, izuzev auranofina koji je blokirao samo fuziju. Interesantno je da je eksperimentalna mutageneza specifičnih cisteina takođe dovela do sprečavanja fuzije virusa sa ćelijama, ali nije uticala na vezivanje sa ACE2 receptorom, pa se veruje da disulfidni mostovi imaju veliki značaj za održavanje konformacije ACE2 receptora nakon fuzije.

Još uvek nepublikovani rezultati Kana (*Khann*) i saradnika, objavljeni u bazi *bioRxiv*, pokazali su da lekovi koji poseduju slobodne tiol grupe, poput cisteamina i WR-1065 (aktivni derivat amifostina), u uslovima *in vitro* smanjuju vezivanje SARS-CoV-2 proteina S za receptor, smanjuju efikasnost ulaska pseudovirusa i inhibiraju infekciju živim virusima (33). Veruje se da je ključna meta ovih tiol jedinjenja raskidanje Cis480-Cis488 disulfidnog mosta zbog činjenice da je dostupan na površini domena virusa koji vezuje receptor, mada direktni dokazi za ovu pretpostavku još uvek ne postoje. Kao što je pomenuto, cepanje preostala tri disulfidna mosta u domenu virusa koji vezuje receptor takođe može alosterički da modifikuje vezivanje za ACE2. Pretpostavka je da i cepanje bočnih disulfidnih mostova na položajima Cis822 i Cis833 domena virusa koji su uključeni u fuziju virusa sa membranom takođe povećava mogućnost da lekovi na bazi tiola inhibiraju ovaj proces. Interesantno je da efikasnost različitih tiol lekova koji inhibiraju ulazak virusa u ćelije varira u zavisnosti od pKa vrednosti, a cisteamin i WR-1065 su se pokazali kao najmoćniji inhibitori. Jači efekat cisteamina u poređenju sa drugim tiolnim lekovima može biti i zbog veće efikasnosti u cepanju disulfidnih mostova na oba domena S proteina, čime su inhibirani vezivanje receptora i fuzija sa membranom. Veruje se da prenamena cisteamina i amifostina za lečenje bolesnika sa COVID 19 ima veliki potencijal jer mikromolarne koncentracije ovih lekova inhibiraju ulazak SARS-CoV-2 u ćelije. Cisteamin se koristi za lečenje cistinoze, a dostupan je u tabletama (uključujući produženo oslobađanje) i kapima za oči (34,35). Amifostin se koristi za lečenje komplikacija radioterapije i dostupan je u infuzionom rastvoru (36). Buduća klinička istraživanja treba da pruže odgovore da li se rezultati ovih *in vitro* istraživanja mogu prevesti u kliničku praksu.

Konflikti interesa

Ovaj rad je realizovan u okviru aktivnosti na projektu "AntioxIdentification", Specijalni program istraživanja COVID-19 koji finansira Fond za nauku Republike Srbije.

Zahvalnica

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Ani Savić Radojević, prof. dr Mariji Plješi Ercegovac i prof. dr Mariji Matić na pažljivom čitanju rada i korisnim sugestijama, kao i doc. dr Tatjani Đukić, doc. dr Vesni Čorić i asist. dr Đurđi Jerotić na pomoći u tehničkoj obradi rada.

Literatura

1. Suhail S, Zajac J, Fossum C, Lowater H, McCracken C, Severson N, et al. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. *Protein J*. 2020; 1–13.
2. Fenouillet E, Barbouche R, Jones IM. Cell entry by enveloped viruses: redox considerations for HIV and SARS-coronavirus. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(8):1009–34.
3. Hati S, Bhattacharyya S. Impact of Thiol–Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor. *ACS omega*. 2020; 5(26):16292–8.
4. Giustarini D, Santucci A, Bartolini D, Galli F, Rossi R. The age-dependent decline of the extracellular thiol-disulfide balance and its role in SARS-CoV-2 infection. *Redox Biol*. 2021; 41:101902.
5. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019; 140:14–27.
6. Bechtel TJ, Weerapana E. From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease. *Proteomics*. 2017; 17(6):1600391.
7. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(10):1329–38.
8. Scirè A, Cianfruglia L, Minnelli C, Bartolini D, Torquato P, Principato G, et al. Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. *Biofactors*. 2019; 45(2):152–68.
9. Giustarini D, Galvagni F, Tesi A, Farolfi A, Zanoni M, Pignatta S, et al. Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. *Free Radic Biol Med*. 2015; 89:972–81.
10. Bartolini D, Giustarini D, Pietrella D, Rossi R, Galli F. Glutathione S-transferase P influences the Nrf2-dependent response of cellular thiols to seleno-compounds. *Cell Biol Toxicol*. 2020; 1–8.
11. Bartolini D, Torquato P, Piroddi M, Galli F. Targeting glutathione S-transferase P and its interactome with selenium compounds in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subj*. 2019; 1863(1):130–43.
12. Pomatto LCD, Davies KJA. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J Physiol*. 2017; 595(24):7275–309.
13. Cuadrado A, Pajares M, Benito C, Jiménez VJ, Escoll M, Fernández-GR, et al. Can activation of NRF2 be a strategy against COVID-19? *Trends Pharmacol Sci*. 2020; 41(9):598–610
14. Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci*. 2009; 106(2):422–7.
15. Yi MC, Khosla C. Thiol–Disulfide exchange reactions in the mammalian extracellular environment. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2016; 7:197–222.
16. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Physiol*. 2008; 295(4):C849–68.
17. Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, Ketterer ME, DiBello PM, Jacobsen DW. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem*. 2001; 276(50):46896–904.

18. Narazaki R, Hamada M, Harada K, Otagiri M. Covalent binding between bucillamine derivatives and human serum albumin. *Pharm Res.* 1996; 13(9):1317–21.
19. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 1999; 277(6):L1067–88.
20. Van Der Vliet A, O'Neill CA, Cross CE, Kooststra JM, Volz WG, Halliwell B, et al. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 1999; 276(2):L289–96.
21. Janssen-Heininger Y, Reynaert NL, van der Vliet A, Anathy V. Endoplasmic reticulum stress and glutathione therapeutics in chronic lung diseases. *Redox Biol.* 2020; 33.
22. Townsend DM, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ, Tew KD. Novel Role for Glutathione S-Transferase π : Regulator of protein s-glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 2009; 284(1):436–45.
23. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, et al. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(4):907–15.
24. Polonikov A. Endogenous deficiency of glutathione as the most likely cause of serious manifestations and death in COVID-19 patients. *ACS Infect Dis.* 2020; 6(7):1558–62.
25. Kalem AK, Kayaaslan B, Neselioglu S, Eser F, Hasanoglu İ, Aypak A, et al. A useful and sensitive marker in the prediction of COVID-19 and disease severity: Thiol. *Free Radic Biol Med.* 2021; 166:11–7.
26. Erel Ö, Neşelioğlu S, Tunçay ME, Oguz EF, Eren F, Akkuş MS, Güner HR, Ateş İ. A sensitive indicator for the severity of COVID-19: Thiol. *Turkish journal of medical sciences.* 2021; 51(3):921-8.
27. Horowitz RI, Freeman PR, Bruzzese J. Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: A report of 2 cases. *Respir Med case reports.* 2020; 30:101063.
28. Jain SK, Parsanathan R. Can vitamin D and L-cysteine co-supplementation reduce 25 (OH)-vitamin D deficiency and the mortality associated with COVID-19 in African Americans? *J Am Coll Nutr.* 2020; 39(8):694–9.
29. Van Hecke O, Lee J. N-acetylcysteine: A rapid review of the evidence for effectiveness in treating COVID-19. 2020.
30. De Flora S, Balansky R, La Maestra S. Rationale for the use of N-acetylcysteine in both prevention and adjuvant therapy of COVID-19. *FASEB J.* 2020; 34(10):13185–93.
31. Click RE. Potential alteration of COVID-19 by beta-mercaptoethanol. *Future Medicine;* 2020. 1313-1318.
32. Manček KM, Hafner BI, Lainšček D, Benčina M, Govednik T, Orehek S, et al. Disruption of disulfides within RBD of SARS-CoV-2 spike protein prevents fusion and represents a target for viral entry inhibition by registered drugs. *FASEB J.* 2021; 35(6):e21651.
33. Khanna K, Raymond W, Charbit AR, Jin J, Gitlin I, Tang M, et al. Binding of SARS-CoV-2 spike protein to ACE2 is disabled by thiol-based drugs; evidence from in vitro SARS-CoV-2 infection studies. *bioRxiv.* 2020;
34. Atallah C, Charcosset C, Greige-Gerges H. Challenges for cysteamine stabilization, quantification, and biological effects improvement. *J Pharm Anal.* 2020; 10(6):499-516.
35. Ariceta G, Giordano V, Santos F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2019; 34(4):571–8.
36. Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. In: *Seminars in radiation oncology.* Elsevier. 2003; 62–72.