

УДК 546.72+577.15+577.121.7

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ТИОСУЛЬФАТНЫМИ ЛИГАНДАМИ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОПЫТАХ IN VITRO

И. И. Файнгольд^{1,2,*}, Р. А. Котельникова¹, А. В. Смолина¹,
Д. А. Полетаева¹, Ю. В. Солдатова^{1,2}, О. В. Покидова¹, А. П. Садков¹,
Н. А. Санина^{1,2,3}, академик РАН С. М. Алдошин^{1,3}

Поступило 28.06.2019 г.

Исследованы антиоксидантные и антирадикальные свойства тетранитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами (ТНКЖ) в гомогенатах головного мозга мышей *in vitro*. Впервые установлено, что ТНКЖ является эффективным антиоксидантом. Изучено влияние ТНКЖ на каталитическую активность митохондриальных ферментов: цитохром *c*-оксидазу и моноаминоксидазу А. Впервые показано, что ТНКЖ является ингибитором каталитической активности цитохром *c*-оксидазы и моноаминоксидазы А в митохондриях головного мозга животных *in vitro*.

Ключевые слова: нитрозильные комплексы железа, пероксидное окисление липидов, антирадикальная активность, хемилюминесценция, цитохром *c*-оксидаза, моноаминоксидаза А.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524885571-575>

Монооксид азота является медиатором множества биохимических и физиологических процессов в живых организмах. NO регулирует тонус клеток гладкой мускулатуры, агрегацию и адгезию тромбоцитов, клеточный рост, апоптоз, заживление ран, иммунный ответ [1]. Пониженный уровень монооксида азота является причиной возникновения и развития множества сердечно-сосудистых заболеваний, именно поэтому NO даёт хорошие терапевтические эффекты при лечении гипертонии, инсульта, атеросклероза, ишемических и реперфузионных повреждений сердца.

Монооксид азота представляет собой нейтральное соединение, имеющее малые размеры и обладающее высокой проницаемостью через плазматические мембраны клеток и субклеточных структур. Однако среднее время жизни молекулы NO в биологических тканях очень мало (5–6 секунд) [2], поэтому в медицине нашли применение фармакологически активные соединения, способные донорить NO в организме. Органические нитраты, давно используемые в клинической практике, обладают

неблагоприятными гемодинамическими эффектами, слабой селективностью, ограниченной биодоступностью, вызывают привыкание [3].

Сера-нитрозильные комплексы железа (НКЖ) благодаря своей способности донорить NO в водных растворах и доставлять его к биологическим мишеням представляют значительный интерес для разработки потенциальных лекарственных препаратов для NO-терапии. Исследование влияния НКЖ на ключевые митохондриальные ферменты биосистем является определяющим фактором их терапевтического действия.

В предлагаемой работе исследуется анионный биядерный тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами ТНКЖ общей формулы $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, синтезированный в ИПХФ РАН [4]. Данное соединение является ингибитором фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ) и Ca^{2+} – Mg^{2+} -зависимой АТФазы саркоплазматического ретикулума в диапазоне концентраций 0,001–0,1 мМ. Торможение каталитической активности ФДЭ цГМФ способствует накоплению цГМФ – вторичного мессенджера в живых организмах, отвечающего за проявление вазодилататорных и антигипертензивных свойств препаратов [5]. Таким образом, влияние ТНКЖ одновременно на две важнейшие ферментативные системы позволяет прогнозировать его высокую фармакологическую эффективность в терапии ряда социально значимых заболеваний, например в кардиологии.

¹ Институт проблем химической физики Российской Академии наук, Черноголовка Московской обл.

² Научно-образовательный центр “Медицинская химия” Московского государственного областного университета, Мытищи Московской обл.

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*E-mail: ifaingold@mail.ru

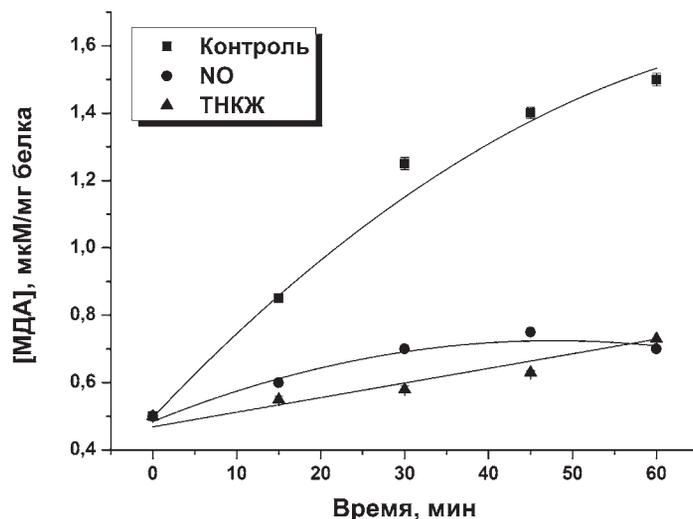


Рис. 1. Скорость накопления МДА в гомогенате головного мозга мышей при действии ТНКЖ и NO в концентрации 1 мМ ($p < 0,05$ – достоверность отличий относительно контроля).

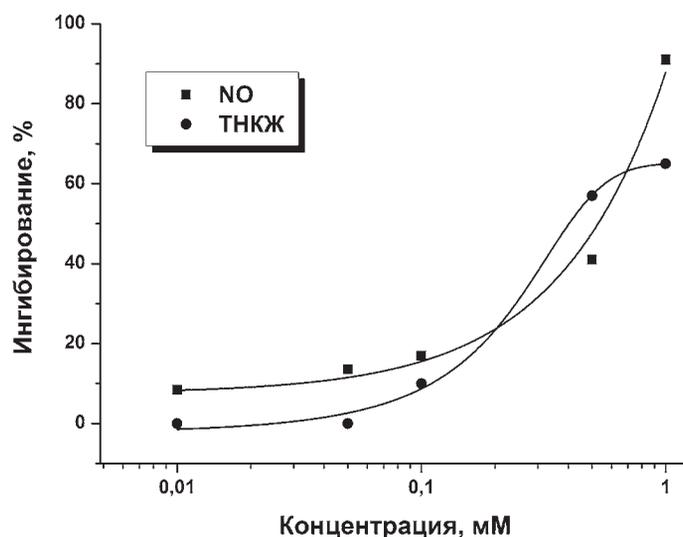


Рис. 2. Зависимость степени ингибирования пероксидного окисления липидов в гомогенате головного мозга мышей от концентрации ТНКЖ и NO.

Поскольку ТНКЖ в результате гидролиза в водных растворах начинает генерировать NO уже в первые секунды после растворения, рабочие растворы комплекса ТНКЖ для экспериментов готовились в анаэробных условиях.

Изучение антиоксидантных свойств потенциальных лекарственных препаратов является актуальной проблемой современной физико-химической биологии, поскольку свободнорадикальные реакции участвуют в патогенезе более чем 50 заболеваний, таких как рак, болезни Альцгеймера и Паркинсона, ишемической болезни сердца, сахарного диабета и др. [6].

В настоящей работе исследована антиоксидантная активность ТНКЖ по содержанию малонового диальдегида (МДА) в гомогенате головного мозга

мышей *in vitro* [7]. Малоновый диальдегид – один из конечных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ). По скорости образования малонового диальдегида можно судить об активации или ингибировании процесса ПОЛ. Кинетические кривые накопления МДА при спонтанном ПОЛ и в присутствии ТНКЖ в концентрации 1 мМ представлены на рис. 1.

Как видно, ТНКЖ эффективно снижает скорость накопления МДА. Экспериментальное сравнение действия ТНКЖ с эффективностью растворенного в воде NO [8] в аналогичных условиях (рис. 1) свидетельствует о том, что антиоксидантная активность комплекса определяется действием NO, высвобождающегося при гидролизе ТНКЖ.

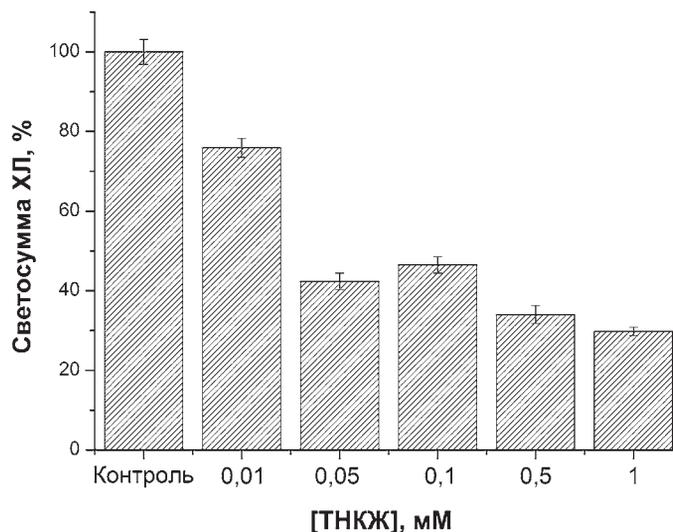


Рис. 3. Изменение светосуммы хемилюминесценции (ХЛ) при действии ТНКЖ в гомогенате головного мозга мышей ($p < 0,05$).

Исследована эффективность IC_{50} антиоксидантного действия ТНКЖ и NO после тридцатиминутной инкубации образцов гомогената головного мозга мышей с добавлением соединений в диапазоне концентраций от 0,01 до 1 мМ, для ТНКЖ IC_{50} составила 0,4 мМ, а для NO – 0,5 мМ (рис. 2).

Антирадикальную активность ТНКЖ определяли в гомогенате головного мозга мышей методом хемилюминесценции (ХЛ) по изменению люминесценции люминола, опосредованной взаимодействием хромофора со свободными радикалами, образование которых инициируется третбутилгидропероксидом (ТБГП) [9]. Содержание свободных радикалов в гомогенате головного мозга мышей оценивали по изменению светосуммы – площади под кинетической кривой интенсивности люминесценции за всё время свечения.

На рисунке 3 показано снижение светосуммы ХЛ люминола при действии ТНКЖ в диапазоне концентраций 0,01–1 мМ. Подобное снижение свечения люминола свидетельствует об антирадикальной активности ТНКЖ. Наиболее эффективное антирадикальное действие ТНКЖ проявил в концентрации 1 мМ, снижая концентрацию активных радикалов в образце на 70% по сравнению с контрольным образцом. Снижение интенсивности хемилюминесценции люминола при действии ТНКЖ обусловлено взаимодействием оксида азота с радикалами липидов, в результате чего происходит обрыв цепи свободнорадикального окисления. Впервые показано, что одним из механизмов антиоксидантного действия комплекса ТНКЖ является его способность перехватывать свободные радикалы, за счёт донирования NO.

Моноаминоксидаза А (МАО-А) – митохондриальный фермент, осуществляющий дезаминирование эндогенных и экзогенных моноаминов: серотонина, норэпинефрина, допамина. Побочными продуктами этих реакций являются токсические вещества, такие как перекись водорода, аммиак и альдегиды [10].

Ингибиторы МАО-А используются в клинике в качестве антидепрессантов, но совсем недавно была открыта роль этого фермента как основного миокардиального источника свободных форм кислорода в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Эксперименты *in vivo* показали, что фармакологическое ингибирование МАО-А предотвращает развитие сердечной недостаточности [11, 12].

Каталитическую активность МАО-А определяли в модельной системе гомогената головного мозга мышей по методике [7]. Спектрофотометрически определяли количество аммиака, выделяющегося в результате реакции ферментативного дезаминирования серотонина. Впервые обнаружено, что комплекс ТНКЖ в концентрациях 0,01 и 0,1 мМ ингибирует каталитическую активность МАО-А на 50% ($20,72 \pm 1,99$ мМ NH_3 /мг белка) и 68% ($13,24 \pm 2,34$ мМ NH_3 /мг белка) относительно контроля ($41,25 \pm 1,27$ мМ NH_3 /мг белка) соответственно.

Таким образом, ТНКЖ может проявлять антидепрессивное и кардиопротекторное действие.

Цитохром *c*-оксидаза (ЦО) – IV комплекс дыхательной цепи митохондрий. ЦО катализирует конечный этап переноса электронов от цитохрома *c* на молекулярный кислород в процессе окислительного фосфорилирования. В экспериментах *in vitro* показано, что фермент имеет более высокую аффинность

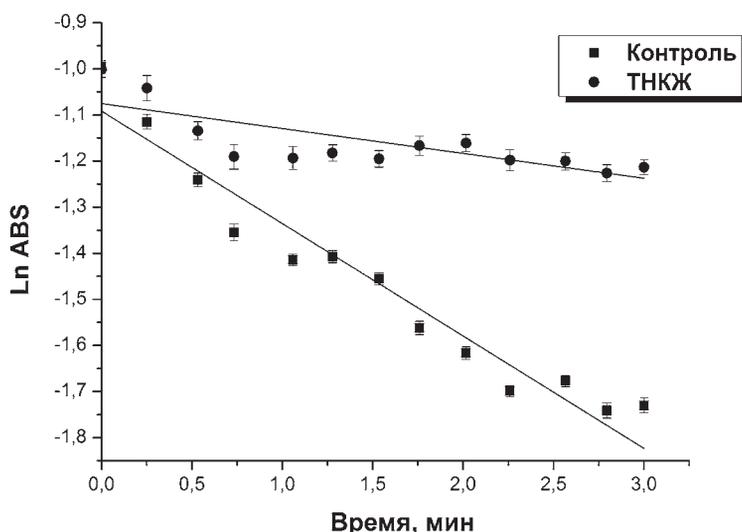


Рис. 4. Линейные анаморфозы кинетических кривых ферментативного окисления цитохрома с цитохром с-оксидазой в присутствии ТНКЖ в концентрации 0,05 мМ. ABS — оптическая плотность образцов при $\lambda = 550$ нм.

к NO, чем к кислороду. Как известно, NO обратимо ингибирует активность ЦО, конкурируя с кислородом за связывание с биядерным центром, таким образом ограничивая потребление кислорода в условиях гипоксии. Этот механизм является основой для развития защитной реакции тканей в ответ на это патологическое состояние. Поэтому доноры NO могут выступать в качестве агентов для терапии гипоксических состояний *in vivo* [13].

В настоящей работе исследовалось влияние ТНКЖ на каталитическую активность ЦО в митохондриях головного мозга мышей с помощью спектрофотометрического метода, основанного на изменении интенсивности поглощения цитохрома с при его ферментативном окислении [14]. Установлено, что ТНКЖ в концентрации 0,05 мМ снижает каталитическую активность ЦО в 4 раза (рис. 4). Эффект ингибирования каталитической активности ЦО связан с взаимодействием NO, выделяемого в результате гидролиза ТНКЖ, с гемами активного центра фермента. Константы скорости ферментативного окисления ЦО в митохондриях при действии ТНКЖ в концентрации 0,05 мМ составляют $(5,27 \pm 1,32) \cdot 10^{-2} / \text{мин}^{-1}$, в контроле $(23,39 \pm 2,38) \times 10^{-2} / \text{мин}^{-1}$ ($p < 0,05$).

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что ТНКЖ обладает выраженной антиоксидантной активностью и выступает в качестве ловушки свободных радикалов, вероятно, в результате взаимодействия монооксида азота (генерируемого ТНКЖ) с радикалами липидов, в результате чего происходит обрыв цепи свободнорадикального окисления. Установлено, что ТНКЖ ингибирует каталитическую активность митохондриальных фермен-

тов: цитохром с-оксидазы и моноаминоксидазы А, что позволяет рассматривать его как потенциальный антидепрессант и кардиопротектор.

Полученный результат указывает на перспективность дальнейшего изучения ТНКЖ с целью создания на его основе лекарственных препаратов для NO-терапии социально значимых заболеваний.

Источники финансирования. Исследования выполнены по теме государственного задания № 0089–2019–0014 и при поддержке Программы президиума РАН на 2018–2020 гг. “Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K.* // Hum. Reprod. Update. 1998. V. 4. № 1. P. 3–24.
2. Nitric Oxide / ed. Ignarro L. N. Y. Academic Press, 2000. 1017 p.
3. *Fung H.-L.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. V. 44. P. 67–85.
4. *Санина Н.А., Алдошин С.М., Руднева Т.Н. и др.* // Координац. химия. 2005. V. 31. № 5. P. 323–328.
5. *Татьяненко Л.В., Котельников А.И., Доброхотова О.В. и др.* // Хим.-фармац. жур. 2009. V. 43. № 9. P. 45–49.
6. *Halliwel B.* // Nutr. Rev. 2012. V. 70. № 5. P. 257–265.
7. *Котельникова Р.А., Григорьев В.В., Смолина А.В. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 10. P. 2375–2382.
8. *Карякин Ю.В., Ангелов И.И.* Чистые химические вещества. Химия. 1974. 408 p.
9. *Di Meo S., Venditti P., Piro M.C., De Leo T.* // Arch. Physiol. Biochem. 1995. V. 103. № 2. P. 187–195.
10. *Bortolato M., Chen K., Shih J.C.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. № 13/14. P. 1527–1533.

11. Mialet-Perez J., Bianchi P., Kunduzova O., et al. // J. Neural Transm. 2007. V. 114. № 6. P. 823–827.
12. Corbineau S., Breton M., Mialet-Perez J., et al. // Int. J. Cardiol. 2017. V. 247. P. 1–6.
13. Taylor C.T., Moncada S. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2010. V. 30, № 4. P. 643–647.
14. Trounce I.A., Kim Y.L., Jun A.S., et al. // Methods Enzymol. 1996. V. 264. P. 484–509.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TETRA NITROSYL IRON COMPLEX WITH THIOSULFATE LIGANDS AND ITS EFFECT ON CATALYTIC ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL ENZYMES *IN VITRO*

I. I. Faingold^{1,2}, R. A. Kotelnikova¹, A. V. Smolina¹, D. A. Poletaeva¹,
Yu. V. Soldatova^{1,2}, O. V. Pokidova¹, A. P. Sadkov¹, N. A. Sanina^{1,2,3},
Academician of the RAS S. M. Aldoshin^{1,3}

¹ Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation

² Medicinal Chemistry Research and Education Center, Moscow region State University, Mytishchy, Moscow region, Russian Federation

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Received June 26, 2019

The antioxidant and antiradical properties of the tetra nitrosyl iron complex with thiosulfate ligands (TNIC) in the mouse brain homogenates *in vitro* were also studied. It was found for the first time that TNIC is an effective antioxidant. The effect of TNIC on the catalytic activity of mitochondrial enzymes: cytochrome *c* oxidase and monoamine oxidase A has been studied. It was shown for the first time that TNIC is an inhibitor of the catalytic activity of cytochrome *c* oxidase and monoamine oxidase A in the brain mitochondria isolated from animals *in vitro*.

Keywords: iron nitrosyl complexes, lipid peroxidation, antioxidant activity, antiradical activity, chemiluminescence, cytochrome *c* oxidase, monoamine oxidase A.