

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, моноаминоксидазы 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

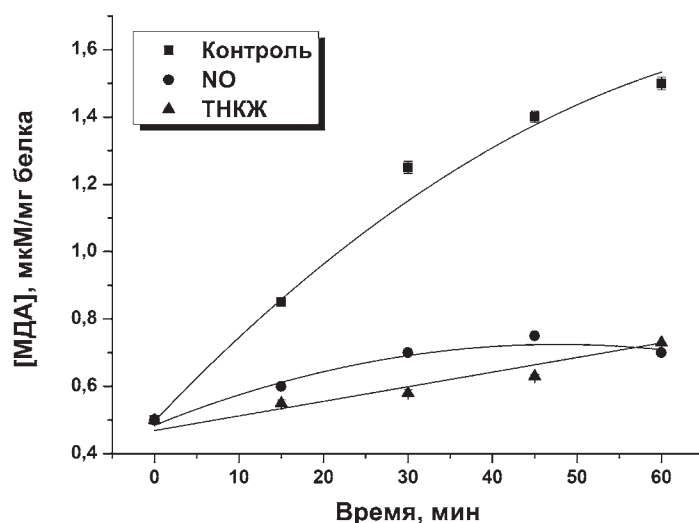


Рис. 1. Скорость накопления МДА в гомогенате головного мозга мышей при действии ТНКЖ и NO в концентрации 1 мМ ($p < 0,05$ – достоверность отличий относительно контроля).

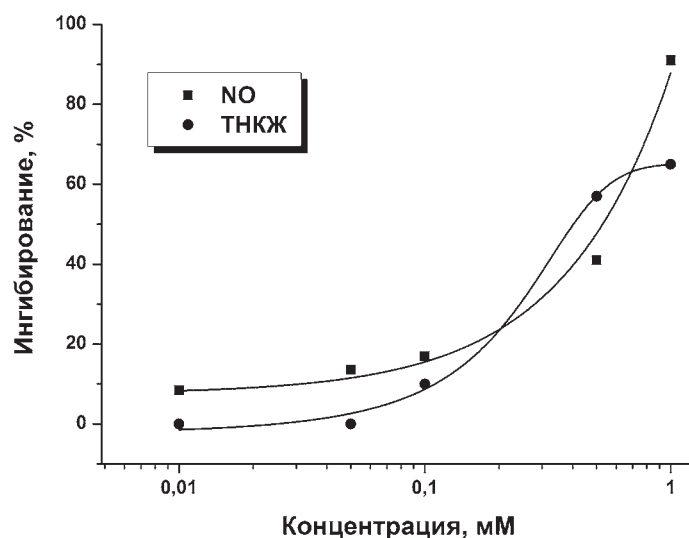


Рис. 2. Зависимость степени ингибирования пероксидного окисления липидов в гомогенате головного мозга мышей от концентрации ТНКЖ и NO.

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.

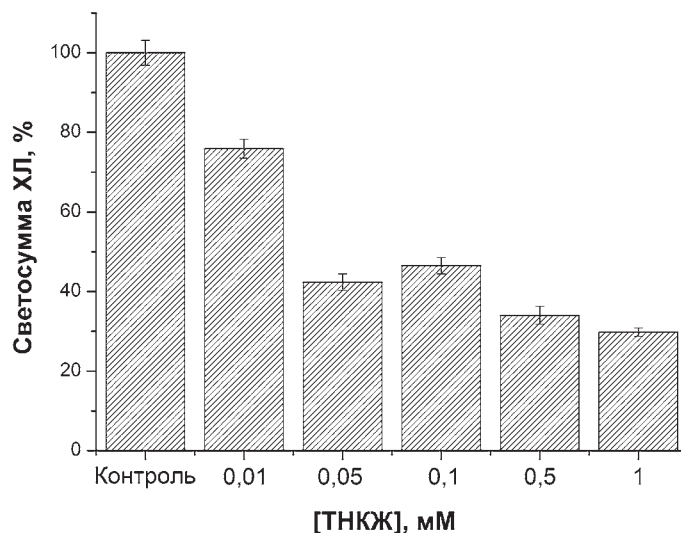


Рис. 3. Изменение светосуммы хемилюминесценции (ХЛ) при действии ТНКЖ в гомогенате головного мозга мышей ($p < 0,05$).

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

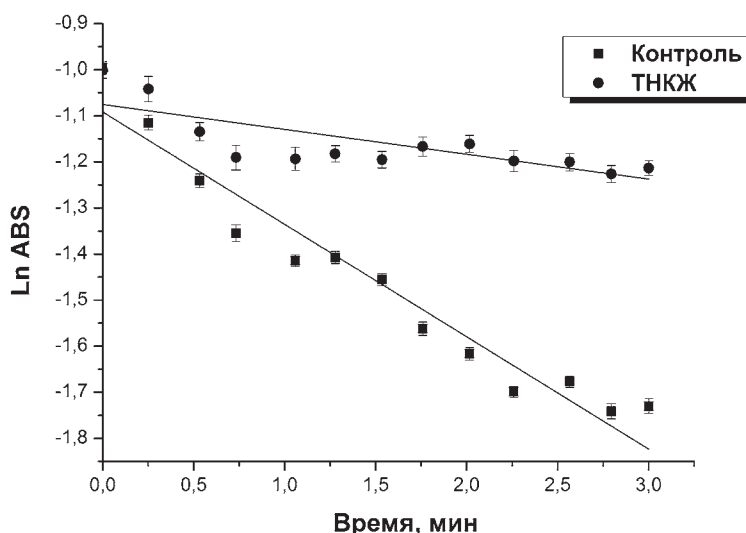


Рис. 4. Линейные анаморфозы кинетических кривых ферментативного окисления цитохрома с цитохром с-оксидазой в присутствии ТНКЖ в концентрации 0,05 мМ. ABS — оптическая плотность образцов при $\lambda = 550$ нм.

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.