ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2018, том 478, № 1, с. 1–6

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.151.04+577.152.313+546.72

ДЕЙСТВИЕ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА – ДОНОРОВ NO – НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+}-АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

© 2018 г. Л. В. Татьяненко, Н. А. Санина, О. В. Доброхотова, А. И. Котельников*, Н. С. Горячев, И. Ю. Пихтелева, Г. И. Козуб, Т. А. Кондратьева**

Представлено академиком РАН С.М. Алдошиным 14.07.2017 г.

Поступило 27.07.2017 г.

Аннотация

DOI:

Исследовали влияние нитрозильных комплексов железа – доноров NO общего состава $[Fe_2(L)_2(NO)_4]$ – с функциональными серусодержащими лигандами (L-3-нитро-фенол-2-ил, 4-нитро-фенол-2-ил и 1-метил-тетразол-5-ил) на активность Ca^{2+}-АТФазы саркоплазматического ретикулума и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ). Исследуемые комплексы разобщали гидролитическую и транспортную функции фермента, нарушая баланс ионов Ca^{2+} в клетках, что может влиять на образование тромбов и адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров, и тормозили активность ФДЭ цГМФ, способствуя накоплению вторичного мессенжера метаболизма цГМФ. Исследованные нитрозильные комплексы железа можно рассматривать в качестве потенциальных лекарственных средств.

Нитрозильные комплексы железа, известные как природные “депо” оксида азота (NO) – универсального соединения, выполняющего роль посредника в межклеточных взаимодействиях, ингибитора агрегации тромбоцитов и их адгезии на стенках кровеносных сосудов и др., образуются в реакциях эндогенного NO с активными центрами негемовых [2Fe-2S] белков [1]. Их синтетические модели используются при разработке нового поколения лекарственных препаратов, применяемых в NO-терапии социально значимых заболеваний [2].

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

**E-mail: kotel@icp.ac.ru; **gor_ns@icp.ac.ru*

Цель настоящей работы – исследовать действие новых доноров NO семейства нейтральных двуядерных тетранитрозильных комплексов железа **1**–**3** (рис. 1), относящихся к двум разным структурным типам, на активность Ca^{2+}-АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ).

Известно, что Ca^{2+}-АТФаза СР катализирует активный транспорт ионов кальция через биологические мембраны за счёт энергии гидролиза субстрата фермента – АТФ. Торможение активного транспорта ионов Ca^{2+} через мембрану СР нарушает соотношение концентрации ионов кальция внутри и вне клеток, что играет важную роль в процессах тромбообразования и адгезии метастатических клеток к эндотелию капилляров [3], предотвращая рост метастазов.

Ингибирование функции ФДЭ цГМФ приводит к накоплению цГМФ, который участвует в важных процессах жизнедеятельности организма и определяет антиагрегационные, вазодилататорные и антигипертензивные функции организма [4].

Исследование влияния новых доноров NO на функцию Ca^{2+}-АТФазы СР и ФДЭ цГМФ способствуют выявлению молекулярных механизмов их биологического действия, позволяющих отбирать соединения как потенциальные лекарственные препараты антиметастатического, а также антиагрегационного, антигипертензивного и вазодилятаторного спектров действия.

Поликристаллические порошки **1**–**3** были синтезированы и охарактеризованы физико-химическими

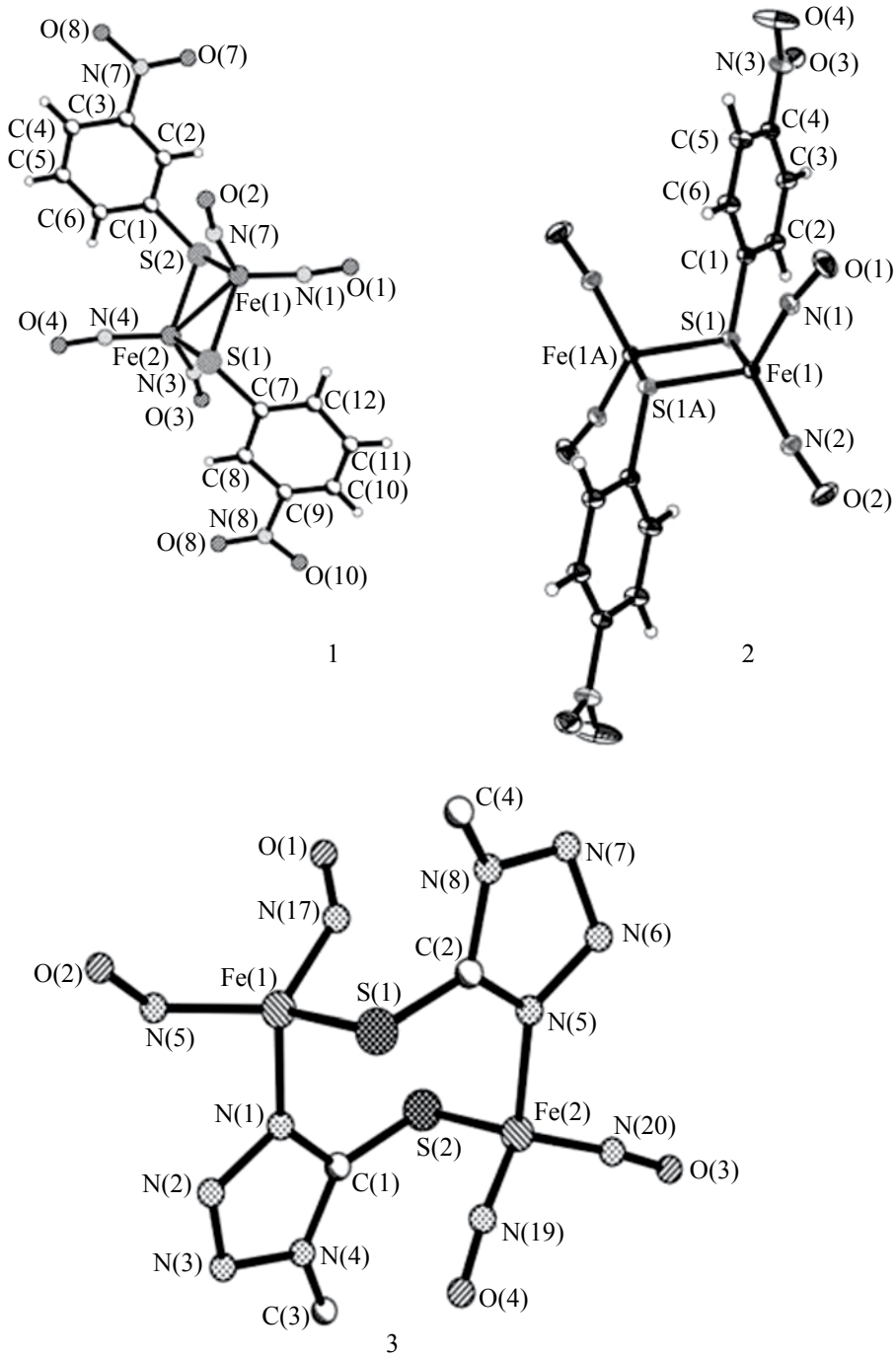

Рис. 1. Молекулярные структуры нейтральных двуядерных тетранитрозильных комплексов железа **1**–**3**.

методами согласно [5–7]. Комплексы **1**–**3** имеют двуядерную структуру (рис. 1), в которой каждый атом железа координирован двумя NO-группами и двумя функциональными серусодержащими лигандами. При этом атомы железа в **1** и **2** (рис. 1) связаны в димеры атомами серы (структурный тип μ-S), а в **3** – мостиками S-C-N (структурный тип μ-N-C-S).

В работе использовали альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидазу из яда кобры, АТФ, гистидин производства фирмы “Sigma-Aldrich”, США; диметилсульфоксид (ДМСО), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), трихлоруксусную кислоту (ТХУ), сахарозу, соли $MgCl_2$, NaCl, KCl, $CaCl_2$, оксалат натрия, молибдат аммония фирмы “Реахим”, Россия, после соответствующей дополнительной очистки.

Все эксперименты по исследованию действия комплексов **1**–**3** на функцию ферментов проводили согласно [8]. Соединения **1**–**3** растворяли в ДМСО и добавляли в объёме 100 мкл на 5,0 мл

реакционной среды. Гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+}-АТФазы СР исследовали после 3 мин преинкубации препарата с ферментом.

Фермент Ca^{2+}-АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов, как описано в нашей предыдущей работе [8]. Удельная активность Ca^{2+}-АТФазы составила 15 мкМ неорганического фосфата на мг в минуту. Гидролитическую активность Ca^{2+}-АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона кинетической кривой гидролиза АТФ. О скорости изменения концентрации ионов Ca^{2+} судили по кинетике их поглощения везикулами СР.

Ингибирование гидролитической активности ферментов рассчитывали по формуле $I = 100(A_0 - A)/A$, где I – относительная активность, A – удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе, A_0 – удельное содержание неорганического фосфора в опытной пробе (в присутствии комплекса). Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури.

Кинетику ингибирования Ca^{2+}-АТФазы СР определяли по зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ) в присутствии и в отсутствие исследуемых соединений **1**, **2** и **3** в концентрациях $4 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.

Обратимость действия соединений определяли путём диализа раствора Ca^{2+}-АТФазы СР, содержащего $2 \cdot 10^{-6}$ М (**1**, **2**) и $1 \cdot 10^{-4}$ М (**3**). Диализ проводили против 100-кратного избытка среды инкубации в отсутствие комплексов в течение 24 ч при 4–5 °С.

Фермент ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс-самцов популяции Wistar. Активность ФДЭ цГМФ в присутствии и отсутствие химического соединения определяли по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, которое было равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении нуклеотидазы. Измерение проводили спектроскопическим методом при длине волны $\lambda = 735$ нм с помощью спектрофотометра Specord M-40 (“Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH”, Германия). Полученные результаты оценивали с помощью параметрических методов статистики. Достоверными считали различия при $p \leq 0{,}05$.

Как видно из табл. 1, соединения **1** и **2** полностью тормозили активный транспорт и гидролиз АТФ в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М. В концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М эти соединения на 72 ± 7 и $52 \pm 5\%$ ингибировали активный транспорт Ca^{2+} и лишь на 18 ± 1 и $22 \pm 2\%$ ингибировали гидролиз АТФ, разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента. Аналогичное разобщающее влияние этих соединений мы наблюдали при использовании концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М. Комплекс **3** на $50 \pm 5\%$ ингибировал транспортную функцию фермента и на $39 \pm 4\%$ – гидролиз АТФ в концентрации, равной $1 \cdot 10^{-4}$ М. Комплекс **1** ингибировал транспорт Ca^{2+} на $44 \pm 4\%$ в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М и не влиял на гидролиз АТФ.

В табл. 2 представлены данные о действии исследованных соединений на активность фермента Ca^{2+}-АТФазы СР. Как видно из таблицы, при гидролизе одной молекулы АТФ в везикулы переносилось меньшее количество ионов кальция, чем

Таблица 1. Влияние нитрозильных комплексов железа на активность $Ca2^{+}$-АТФазы СР

Индексы соединений	Торможение активности Ca^{2+}-АТФазы СР (в процентах от контроля)									
	Концентрации соединений в пробах, М									
	$1 \cdot 10^{-4}$		$1 \cdot 10^{-5}$		$1 \cdot 10^{-6}$		$1 \cdot 10^{-7}$		$1 \cdot 10^{-8}$	
	Активный-транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный-транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
1	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	72 ± 7	18 ± 1*	54 ± 5	$14 \pm 0{,}4$*	44 ± 4	0*
2	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	52 ± 5	22 ± 2*	37 ± 4	14 ± 1*	–	–
3	50 ± 5	39 ± 4*	41 ± 4	20 ± 2*	15 ± 0.5	10 ± 1	–	–	–	–

$M \pm m$, $n = 6$–9. *$p < 0{,}01$ при сравнении показателей гидролиза АТФ с показателями активного транспорта Ca^{2+}. Прочерк – определение не проводили.

Таблица 2. Влияние нитрозильных комплексов железа в разных концентрациях на отношение $[Ca^{2+}]/[АТФ]$

Индексы соединений	Концентрация соединений, М											
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
	Гидролиз АТФ Ед. удельной активности				Активный транспорт Ca^{2+} Ед. удельной активности				Отношение $[Ca^{2+}]/[АТФ]$			
1	0	0	2,2	2,6	0	0	1,5	2,9	0	0	0,7*	1,1*
2	0	0	2,3	2,5	0	0	2,6	3,5	0	0	1,1*	1,4*
3	2,6	1,97	1,8	3,4	3,7	3,2	5,96	–	1,4*	1,6*	1,8	–

Отношение $[Ca^{2+}]/[АТФ]$ в контроле составило 1,9. *$p < 0{,}01$ по сравнению с контролем.

в контроле ($АТФ/Ca^{2+} = 1{:}\ 1{,}9$). При этом менялось отношение вне- и внутриклеточного ионов кальция, что, безусловно, могло нарушить агрегацию тромбоцитов, их связь с метастатическими клетками опухоли и предотвратить адгезию последних к стенкам сосудов [9–11].

На следующем этапе работы мы исследовали механизм действия комплексов **1–3** как модуляторов активности Ca^{2+}-АТФазы СР. Как видно из табл. 3, комплексы **1**, **2** в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М и комплекс **3** в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М после диализа практически полностью прекратили ингибирование гидролитической и транспортной функции Ca^{2+}-АТФазы СР. Это указывает на нековалентное связывание комплексов с ферментом, т.е. комплексы **1–3** – обратимые ингибиторы функции Ca^{2+}-АТФазы СР. Комплексы **1** и **2** обладали такой же ингибирующей активностью, как и их изоструктурный аналог – комплекс **2** в нашей предыдущей работе [8], который содержал NH_2-группу в положении 4 фенильного кольца. Кроме того, комплекс **1**, исследуемый в настоящей работе, обладал выраженной ингибирующей активностью при использовании самых низких концентраций. Таким образом, замена заместителя не дала заметного увеличения активности Ca^{2+}-АТФазы СР, но позволила повысить активность этого фермента при использовании низких концентраций комплекса.

Более полное представление о механизме действия соединений на фермент мы получили, применив кинетический метод исследования ферментативных реакций, позволяющий судить о характере связывания фермента с ингибитором. Характер влияния обратимо действующего ингибитора определяется зависимостью обратных величин скорости ферментативной реакции (1/V) от концентрации субстрата (1/S) [12]. Используя численные значения максимальных скоростей гидролиза АТФ, мы рассчитали величину константы ингибирования (K_i) под влиянием соединений **1**, **2** и **3** на Ca^{2+}-АТФазу СР. Как видно из рис. 2–4 комплексы **1–3** неконкурентно ингибировали гидролитическую функцию Ca^{2+}-АТФазы СР с $K_i = 2 \cdot 10^{-6}$, $K_i = 1 \cdot 10^{-6}$ и $K_i = 3{,}3 \cdot 10^{-4}$ М соответственно, что свидетельствует о том, что комплексы **1–3** не связывались с активным центром фермента. Ингибирование Ca^{2+}-АТФазы СР комплексом **3** было

Таблица 3. Влияние нитрозильных комплексов железа на гидролитическую и транспортную функцию Ca^{2+}-АТФазы СР до и после диализа

Индексы соединений	Торможение Ca^{2+}-АТФазы СР, проценты от контроля			
	До диализа		После диализа	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
1	75 ± 7	20 ± 2	23 ± 3*	0*
2	50 ± 5	25 ± 2	20 ± 2*	0*
3	50 ± 5	39 ± 4	15 ± 1*	0*

В диализуемые пробы добавляли $1 \cdot 10^{-6}$ М соединений **1**, **2** и $1 \cdot 10^{-4}$ М соединения **3**. $M \pm m$, $n = 3$. *$p < 0{,}01$ по сравнению с данными до диализа.

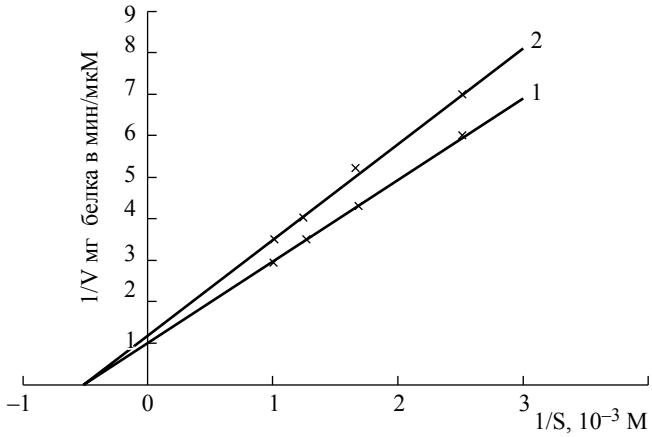

Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата ($1 \cdot 10^{-3}$–$4 \cdot 10^{-4}$ М) в координатах Лайнуивера–Берка. (1) – в отсутствие комплекса **1**. (2) – в присутствии комплекса **1** в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М.

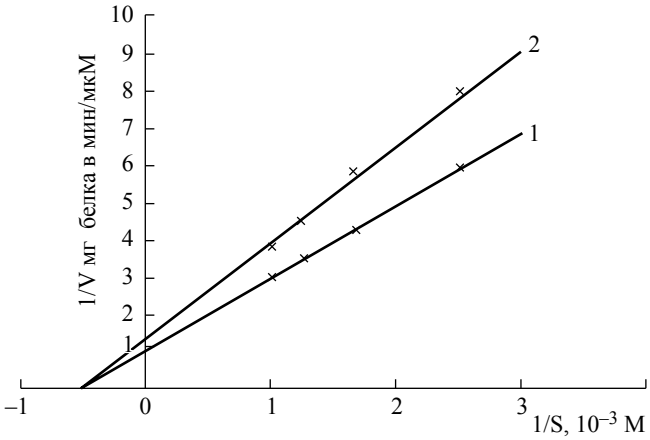

Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата ($1 \cdot 10^{-3}$–$4 \cdot 10^{-4}$ М) в координатах Лайнуивера–Берка. (1) – в отсутствие комплекса **2**. (2) – в присутствии комплекса **2** в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М.

на два порядка выше такового его структурного аналога – комплекса с 1-фенил-1Н-5 меркаптотетразолилом, исследованного нами ранее (комплекс **5** в работе [8]): K_i комплекса **3** было равно $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ М, а K_i его структурного аналога **5** (по данным [8]) – $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Как видно из табл. 4, все исследованные сера–нитрозильные комплексы железа тормозили функцию ФДЭ цГМФ в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М. Соединения **1**–**3** соответственно на 88 ± 9, 96 ± 9, 78 ± 9% снижали активность ФДЭ цГМФ при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М и на 61 ± 6, 40 ± 4, 30 ± 3% – при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М. Эти результаты позволяют предположить наличие у исследуемых комплексов антиагрегационных, антигипертензивных и вазодилататорных свойств, что связано с накоплением важного вторичного мессенжера метаболизма – цГМФ. При этом ингибирующая способность комплексов **1** и **2** была значительно выше, чем таковая для изоструктурного комплекса с фенильным лигандом

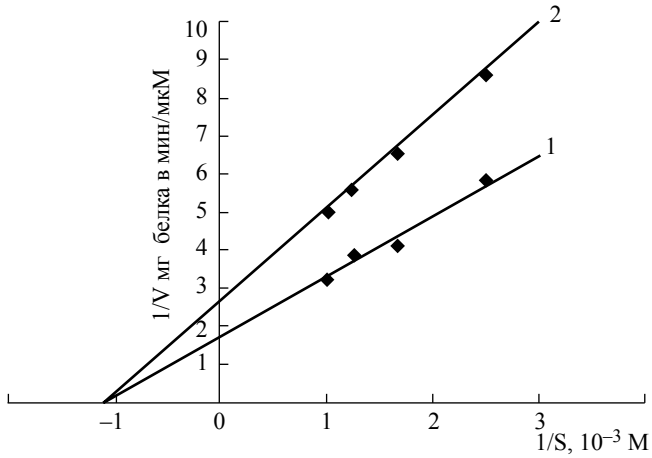

Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза АТФ Ca^{2+}-АТФазой СР от концентрации субстрата АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$–$4 \cdot 10^{-4}$ М) в координатах Лайнуивера–Берка. (1) – в отсутствие комплекса **3**. (2) – в присутствии комплекса **3** в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М.

Таблица 4. Влияние нитрозильных комплексов железа на активность ФДЭ цГМФ

Индексы соединений	Торможение активности ФДЭ цГМФ, проценты от контроля		
	Концентрация соединений, М		
	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
1	88 ± 9*	61 ± 6*	16 ± 2
2	96 ± 9*	40 ± 4*	12 ± 1
3	78 ± 8*	30 ± 3*	0

$M \pm m$, n = 6–8. *p <0,01 по сравнению с контрольными пробами, не содержащими соединений.

(соединение **2** в работе [8]), и, по-видимому, связана с наличием нитрогрупп в фенильном кольце лиганда комплексов. Иначе, введение заместителей в фенильное кольцо (в данном случае акцепторных нитрогрупп) здесь играет положительную роль и открывает перспективы для дизайна новых нитрозильных комплексов структурного типа μ-S – эффективных ингибиторов ФДЭ цГМФ. Необходимость использования более объёмных серусодержащих лигандов в синтезе тетранитрозильных двуядерных комплексов железа для усиления их ингибирующей способности подтверждается данными, полученными для комплексов структурного типа μ-N-C-S, к которым относится исследуемый в настоящей работе комплекс **3**: его ингибирующая активность значительно ниже при концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ М, чем таковая для его изоструктурного аналога с фенильным заместителем вместо метильного в тетразольном кольце лиганда (соединение **5** в работе [8]).

Таким образом, полученные результаты при изучении действия новых сера–нитрозильных комплексов железа на ключевые ферментные системы живых организмов – Ca^{2+}-АТФазу СР и ФДЭ цГМФ позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов антиметастатического, антиагрегационного, антигипертензивного и вазодилататорного спектров действия и осуществлять направленный дизайн миметиков нейтральных [2Fe-2S] нитрозилов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (№ Государственной регистрации темы 0089–2014–0037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lewandowska H., Kalinowska M., Brzoska K., Wojciuk K., Wojciuk G., Kruszewski M.* Nitrosyl iron complexes – synthesis, structure and biology // Dalton. Trans. 2011. V. 40. P. 8273–8289.
2. *Алдошин С.М., Санина Н.А.* Функциональные нитрозильные комплексы железа – новый класс доноров монооксида азота для лечения социально значимых заболеваний. В сб. Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии. М.: МАКС Пресс, 2015. Т. 1. С. 72–102.
3. *Татьяненко Л.В., Коновалова Н.П., Богданов Г.Н. Доброхотова О.В. Федоров Б.С.* //Журн биомед. Химии. 2006. Т. 52. № 1. С. 52–59.
4. *Граник В.Г., Григорьев Н.Б.* Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузов. Кн., 2004. 360 с.
5. *Sanina N.A., Krivenko A.G., Manzhos R.A., Emel'yanova N.S., Kozub G.I., Korchagin D.V., Shilov G.V., Kondrat'eva T.A., Ovanesyan N.S., Aldoshin S.M.* Influence of Aromatic Ligand on the Redox-Activity of Neutral Binuclear Tetranitrosyl Iron Complexes [Fe2(μ-SR)2 (NO)4]: Experiments and Quantum-Chemical Modeling //New J. Chem., 2014. V. 38. P. 292–301.
6. *Ананьев И.В., Медведев М.Г., Алдошин С.М., Еременко И.Л., Лысенко К.А.* Колебательное размывание электронной плотности как функция прочности и направленности межатомных взаимодействий: невалентные взаимодействия нитрогруппы в островном кристалле $[Fe(NO)_2(S\text{-}C_6H_4NO_2)]_2$ // Изв/ АН. Сер. хим. 2016. № 6. С. 1473–1483.
7. *Санина Н.А., Корчагин Д.В., Шилов Г.В., Куликов А.В., Шестаков А.Ф., Сулименков И.В., Алдошин С.М.* Строение бис(1-метил-тетразол-5-тиолат)тетранитрозил дижелеза и его интермедиатов в растворах //Кординац. Химия. 2010. Т. 36. № 12. С. 888–898.
8. *Татьяненко Л.В., Доброхотова О.В., Котельников А.И, Санина Н.А., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А., Алдошин С.М.* // Хим.-фарм. Журн., 2013. Т. 47. № 9. С. 3–6.
9. Fidler F. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 6130–6138.
10. *Honn K., Onoda F., Diglio C., Sloane B.* // Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 1983. V. 174. P. 16–17.
11. *Schmark G.A., Levfer A.M.* // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1982. V. 35. P. 177–178.
12. *Березин И.В., Клессов А.А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1973. С. 77–84.