

Л. В. Татьянаенко, А. И. Котельников, О. В. Доброхотова,
Е. А. Саратовских, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, С. М. Алдошин

ВЛИЯНИЕ НИТРОЗИЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗО-СЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ

Институт проблем химической физики Российской академии наук, 142432, Московская область,
Черноголовка, Россия; e-mail: kotel@icp.ac.ru

В настоящей работе исследовано влияние на ферментативную активность гидролитических ферментов — фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ) и Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимой АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) — ряда доноров NO на основе новых сера-нитрозильных комплексов железа: анионного тиосульфатного комплекса $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I) и нейтральных тиолатных комплексов с общей формулой $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$ с R = 1-метил-имидазол-2-ил (II), 3-амино-1,2,4-триазол-5-ил (III), фенил (IV). Показано, что все исследованные комплексы являются ингибиторами функции ФДЭ цГМФ и Ca^{2+} -АТФазы СР в диапазоне концентраций 0,1 – 0,001 мМ. При этом соединения I и II тормозят активность ФДЭ цГМФ, константы ингибирования $K_i = 1$ мкМ и $K_i = 5$ мкМ соответственно, что более эффективно по сравнению с применяемым на практике лекарственным препаратом Никорандил, $K_i = 0,1$ мМ. Торможение функции ФДЭ цГМФ способствует накоплению цГМФ-вторичного мессенджера живых организмов, ответственного за проявление вазодилаторных антиагрегационных и антигипертензивных свойств препаратов. Ингибирование Ca^{2+} -АТФазы СР блокирует активный транспорт ионов Ca, что влияет на их баланс в клетках и на проявление выше указанных фармакологических эффектов. Полученные результаты позволяют прогнозировать механизмы действия данного класса химических соединений в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата, Ca-АТФаза саркоплазматического ретикулума, ингибиторы, нитрозильные железо-серные комплексы.

Известно, что ингибирование функции фермента ФДЭ цГМФ приводит к накоплению цГМФ, являющегося вторичным мессенджером, определяющим вазодилаторный, антигипертензивный и антиагрегационные эффекты ряда лекарственных препаратов [1 – 3]. Кроме того, нарушение баланса ионов Ca в клетках влияет на физиологические процессы и фармакологический эффект [4]. Ингибирование активного транспорта ионов Ca через мембрану саркоплазматического ретикулума (СР) за счет энергии гидролиза АТФ, осуществляемого Ca^{2+} -АТФазой СР, изменяет соотношение внутри- и внеклеточного содержания ионов кальция, что предотвращает образование тромбов с последующей адгезией метастатических клеток к эндотелию капилляров [5 – 9].

Целью настоящего исследования является изучение влияния новых сера-нитрозильных комплексов железа различных структурных типов на функцию ФДЭ цГМФ и Ca^{2+} -АТФазы СР, а также выявление механизмов действия данного класса химических соединений как доноров NO при рассмотрении их в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Экспериментальная химическая часть

Описание синтеза исследовавшегося анионного тиосульфатного сера-нитрозильного комплекса железа $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I), данные элементного анализа, УФ-, ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа приведены в работе [10]. Для нейтраль-

ных тиолатных комплексов с общей формулой $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$, где R = 1-метилимидазол-2-ил (II), 3-амино-1,2,4-триазол-5-ил (III), фенил (IV) условия синтеза и соответствующие характеристики указаны в [11 – 13]. Структурные формулы комплексов I – IV, полученные методом рентгеноструктурного анализа, приведены на рис. 1. В качестве препарата сравнения использовался никорандил — N-(2-нитроксиэтил)никотинамид.

Экспериментальная биологическая часть

В работе использовались цГМФ, нуклеотидаза (в виде яда кобры), гистидин, альбумин человека, имидазол, АТФ производства фирмы Sigma, без дополнительной очистки, а также диметилсульфоксид (ДМСО), трихлоруксусная кислота (ТХУ), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сахароза; соли MgCl_2 , KCl , NaCl , Na оксалат, CaCl_2 , молибдат аммония (MoNH_4) фирмы “Реахим”, Россия, применялись после соответствующей дополнительной очистки.

Фермент ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии “Вистар” [14]. Ткань головного мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по массе количестве охлажденного 0,2 М трис-буфера, pH 7,45. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40 000 g. Супернатант, содержащий ФДЭ цГМФ, замораживали в жидком азоте. Активность ФДЭ цГМФ определяли по количеству образующегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, ко-

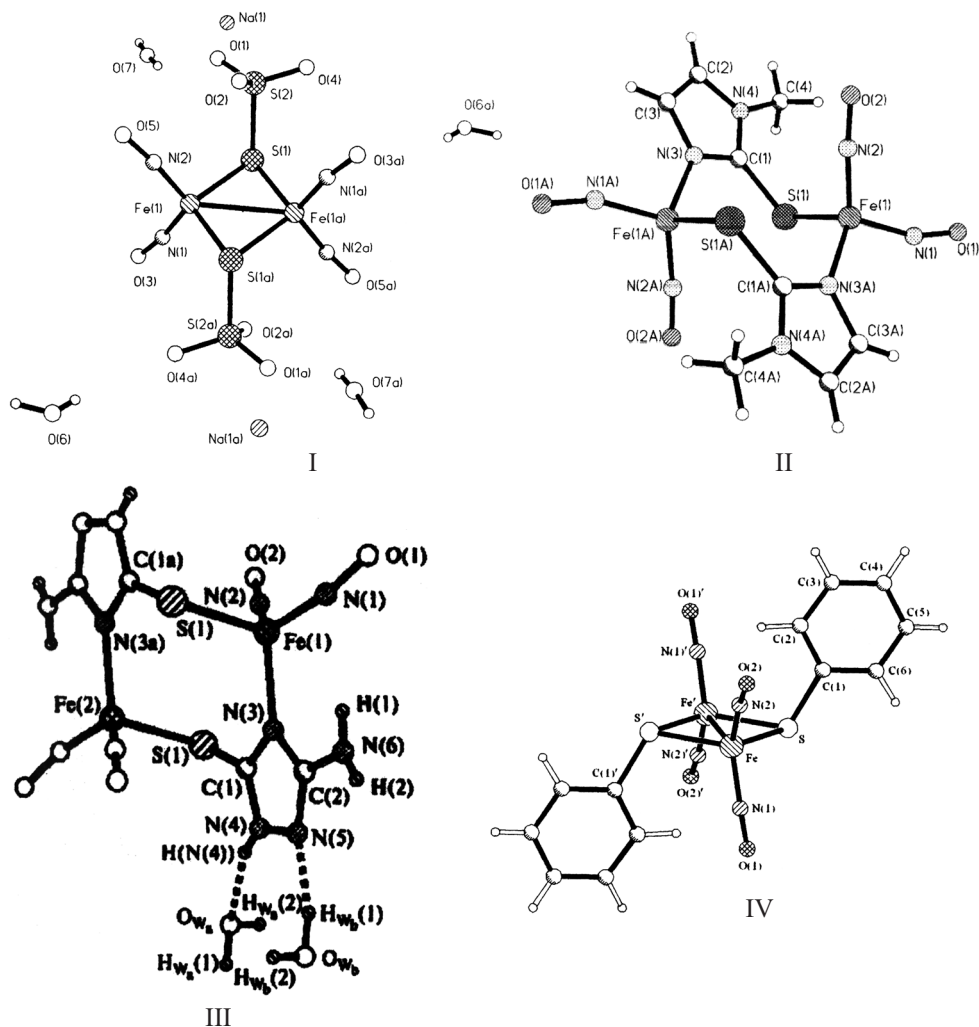


Рис. 1. Молекулярные структуры сера-нитрозильных комплексов железа: анионного тиосульфатного комплекса $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I); нейтральных тиолатных комплексов с общей формулой $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$, где R = 1-метилимидазол-2-ил (II); 3-амино-1,2,4-триазол-5-ил (III); фенил (IV).

торое, в свою очередь, равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении нуклеотидазы [14].

Удельная активность фермента составляла 7 мкМ Рн/мг белка в мин.

Таблица 1
Влияние нитрозильных железо-серных комплексов на активность ФДЭ цГМФ коры головного мозга крысы

Комплекс	Торможение активности ФДЭ цГМФ, % от контроля		
	Концентрация комплексов:		
	0,1 мМ	0,01 мМ	1 мкМ
I	100 ± 10*	87 ± 9*	65 ± 7*
II	100 ± 10*	67 ± 7*	42 ± 4*
III	100 ± 10*	70 ± 7*	60 ± 6*
IV	62 ± 6*	45 ± 5*	27 ± 3*
Никорандил	64 ± 6*	50 ± 5*	34 ± 3*

Примечание: приведены средние данные 6–9 опытов с каждым препаратом.

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [15]. При определении активности ФДЭ цГМФ к 1 мл 0,2 М трис-буфера (рН 7,6) добавляли аликвоту раствора ФДЭ цГМФ, содержащего 0,1 мг белка. Исследуемые комплексы добавляли в виде растворов в воде или в ДМСО, в объеме 0,2 мл, конечная концентрация в пробе составляла 0,1 мМ, 0,01 мМ и 0,001 мМ. Общий объем пробы — 2,0 мл. Через 30 мин преинкубации при комнатной температуре в пробу добавляли 0,1 мМ цГМФ. Пробы выдер-

Таблица 2
Торможение нитрозильными железо-серными комплексами функции ФДЭ цГМФ до и после диализа

Комплексы, 0,1 мМ	Ингибирование активности ФДЭ цГМФ, % от контроля	
	до диализа	после диализа
I	80 ± 9	20 ± 2*
II	62 ± 6	10 ± 1*

Примечание: приведены средние данные 6–9 опытов с каждым препаратом.

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем, до диализа.

живали в течение 20 мин при 30 °С, после чего их помещали на 3 мин в кипящую водяную баню. Затем в охлажденные до комнатной температуры пробы добавляли 50 мкг нуклеотидазы (в виде яда кобры), и выдерживали их при 30 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0,2 мл 55 % ТХУ, и реакционную смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. При определении активности ФДЭ цГМФ содержание неорганического фосфата в отделенном супернатанте определяли по реакции с молибдатом аммония, методом спектрофотометрии на спектрофотометре “Specord M-40” (производства ГДР, г. Йена, фирма “Карл Цейс”). Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$I = 100(A_0 - A)/A_0,$$

где I — относительная активность; A_0 — удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе (без ингибитора — комплекса); A — удельное содержание неорганического фосфата в опытной пробе (в присутствии комплекса).

Для определения характера ингибирования комплексами реакции ФДЭ цГМФ исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (цГМФ) в присутствии и в отсутствие исследуемых ингибиторов в концентрациях, вызывающих торможение активности фермента не менее чем на 50 % [16]. Обратимость ингибирования определяли путем диализа раствора ФДЭ цГМФ, содержащего 0,1 мМ комплекса (I), растворенного в H₂O, или комплекса (II), растворенного в ДМСО. Конечная концентрация ДМСО в опыте составляла 5 % и не влияла на активность фермента. Диализ проводили против 200 мл 0,02 М трис-НСI буфера в течение 24 ч при 4 – 5 °С в отсутствие исследуемых комплексов.

Са-АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов [17]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (0,5 л раствора на 100 г мышц) в присутствии 10 мМ ЭДТА, рН 7,5. Мышцы измельчали, помещали в среду, содержащую 10 мМ

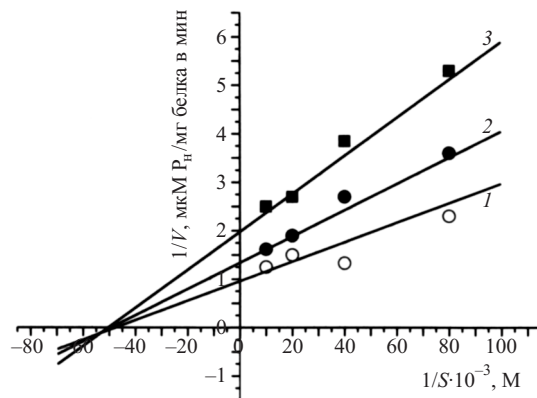


Рис. 2. Зависимость обратной скорости гидролиза цГМФ ФДЭ от концентрации субстрата (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 мМ) в координатах Лайуивера — Берка: 1 — без ингибитора; 2 — в присутствии 0,01 мМ комплекса I; 3 — в присутствии 0,05 мМ комплекса I.

гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 10 % сахарозе, рН 7,0 и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 10 000 g 20 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 6 слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 36 000 g 60 мин. Осадок суспендировали в среде, содержащей 0,6 М КСI и 10 мМ гистидина при рН 7,0 – 7,2, а затем измельчали в гомогенизаторе Поттера. К полученному гомогенату добавляли человеческий альбумин и инкубировали при постоянном перемешивании в холодильнике 8 – 10 ч. Затем гомогенат центрифугировали при 40 000 g в течение 90 мин. Из центрифужных пробирок отбирали средний желеобразный слой, который суспендировали в среде, содержащей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30 % сахарозе, рН 7,0. Полученный таким образом гомогенат замораживали в жидком азоте и использовали в качестве фермента. Активность Са²⁺-АТФазы измеряли по методу [17]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl₂, 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, 5 мМ оксалата Na, 0,04 мг белка, 3 мМ АТФ, рН 7,2. Реакцию индуцировали добавлением 0,1 мМ СаCl₂. Гидролитическую активность Са²⁺-АТФазы определяли по кинетике изменения рН среды в

Таблица 3

Влияние нитрозильных железо-серных комплексов на активный транспорт ионов Са через мембрану СР и гидролиз АТФ

Комплекс	Торможение активности Са ²⁺ -АТФазы, % от контроля					
	концентрация комплексов:					
	0,1 мМ		0,01 мМ		1 мкМ	
	Активный транспорт Са ⁺²	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Са ⁺²	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Са ⁺²	Гидролиз АТФ
I	100 ± 5*	100 ± 0,5*	52 ± 5*	4 ± 0,4	46 ± 5*	3 ± 0,3
II	100 ± 10*	40 ± 4*	100 ± 10*	20 ± 2*	17 ± 2*	0
III	100 ± 6*	26 ± 3*	26 ± 3*	14 ± 1	20 ± 2*	18 ± 1*
IV	20 ± 2*	0	17 ± 1*	0	17 ± 2*	0
Никорандил	42 ± 4*	26 ± 3*	36 ± 3*	20 ± 2*	28 ± 3*	0

Примечание: приведены средние значения 6 – 9 опытов с каждым препаратом.

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

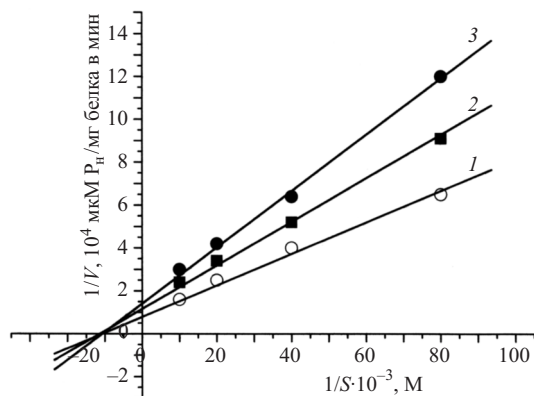


Рис. 3. Зависимость обратной скорости гидролиза цГМФ ФДЭ цГМФ от концентрации субстрата (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 мМ) в координатах Лайуивера — Берка: 1 — без ингибитора; 2 — в присутствии 0,01 мМ комплекса II; 3 — в присутствии 0,05 мМ комплекса II.

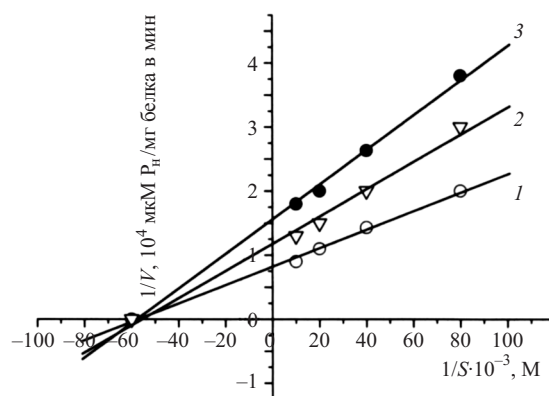


Рис. 4. Зависимость обратной скорости гидролиза цГМФ ФДЭ цГМФ от концентрации субстрата (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 мМ) в координатах Лайуивера — Берка: 1 — без ингибитора; 2 — в присутствии 0,05 мМ никорандила; 3 — в присутствии 0,1 мМ никорандила.

результате ферментативного гидролиза АТФ, так как в указанной реакции соотношение образующихся фосфат-ионов и протонов в растворе составляет 1:1. Удельная активность Ca^{2+} -АТФазы составляла 15 000 мкМ Рн/мг белка в мин. О скорости изменения концентрации ионов Са судили по времени их полного поглощения везикулами СР, что приводит к прекращению реакции гидролиза АТФ.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, все исследованные сера-нитрозильные комплексы железа, являющиеся донорами NO [18], проявляют выраженную ингибирующую активность на функцию ФДЭ цГМФ. При этом комплексы I – III по силе действия превосходят никорандил.

Важным вопросом механизма действия исследуемых комплексов на фермент является изучение обратимости их действия на работу ФДЭ цГМФ.

Установлено, что после диализа активность фермента восстанавливается практически до уровня контроля (табл. 2), что указывает на нековалентное связывание комплексов I и II с активным центром фермента. Эти комплексы являются обратимыми ингибиторами функции ФДЭ цГМФ.

Более полные представления о механизме ингибирования ФДЭ цГМФ дает кинетический метод исследования ферментативных реакций, позволяющий судить о характере связывания фермента с ингибитором. Характер влияния обратимо действующего ингибитора на активность ФДЭ цГМФ определяется зависимостью обратных значений скорости ферментативной реакции ($1/V$) и концентрации субстрата ($1/S$).

Из рис. 2 видно, что комплекс I является неконкурентным ингибитором функции ФДЭ цГМФ с $K_i = 1$ мкМ, что на 2 порядка ниже, чем константа ингибирования никорандила, $K_i = 0,1$ мМ (рис. 4). Комп-

Таблица 4

Влияние различных концентраций нитрозильных железо-серных комплексов на гидролитическую и транспортную функции Ca^{+2} -АТФазы СР. Определение индекса Ca^{+2} /АТФ

Комплекс	Активность Ca^{+2} -АТФазы СР в единицах удельной активности, мкМ Рн/мг/мин								Отношение Ca^{+2} /АТФ				
	Контроль		Концентрации комплексов:						Контроль		Концентрации комплексов		
	Активный транспорт Ca^{+2}	Гидролиз АТФ	0,1 мМ		0,01 мМ		1 мкМ		Активный транспорт Ca^{+2}	Гидролиз АТФ	0,1 мМ	0,01 мМ	1 мкМ
	4,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3							1,4				
I	—	—	1,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3*	2,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2*	3,1 ± 0,3	—	0,63	0,69	0,68	
II	—	—	0*	1,9 ± 0,2*	0*	2,6 ± 0,3	3,5 ± 0,4	3,1 ± 0,3	—	0	0	1,14	
III	—	—	0*	2,3 ± 0,2*	3,1 ± 0,3*	2,7 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	—	0	1,15	1,2	
IV	—	—	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,3	—	1,1	1,2	1,13	
Никорандил	—	—	2,4 ± 0,2*	2,3 ± 0,2*	2,69 ± 0,33*	2,5 ± 0,3	3,0 ± 0,3*	3,1 ± 0,1	—	1,0	1,0	0,96	

Примечание: приведены процентные значения 6 – 9 опытов по торможению активности ФДЭ цГМФ с каждым препаратом ($M \pm m$) %.
* $P < 0,01$ по сравнению с контролем

лекс II также является неконкурентным ингибитором функции ФДЭ цГМФ с $K_i = 5$ мкМ (рис. 3).

Как видно из табл. 3, исследованные металлокомплексы тормозят активный транспорт ионов Са через мембрану СР и гидролиз АТФ. При этом наблюдается разобщение гидролитической и транспортной функций фермента (табл. 4). Как известно, в норме гидролиз 1 молекулы АТФ приводит к переносу 2 ионов Са через мембрану СР. Как видно из табл. 4, ингибирующее действие нитрозильных комплексов железа на активный транспорт ионов Са сопровождается снижением соотношения $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$. Наблюдаемое разобщение гидролиза АТФ и активного транспорта ионов Са при действии изучаемых комплексов железа показывает, что при гидролизе одной молекулы АТФ в цистерны СР переносится меньшее количество ионов Са, чем в норме. Возникающее при этом изменение соотношения концентрации вне и внутриклеточного Са способствует нарушению агрегации тромбоцитов и их связыванию с метастатическими клетками опухоли [6].

Таким образом, полученные результаты по действию новых железо-серных комплексов на ключевые ферментные системы живых организмов — ФДЭ цГМФ и Ca^{2+} -АТФазу СР — позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. Ring, *Modern Drug Discovery*, Nov./Dec, 31 (1998).

2. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Изв. АН., Сер. хим.*, № 8, 1268 (2002).
3. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вуз. книга, Москва (2004), с. 360.
4. D. Basil, Roufogalis, Shi Chen, et al., *An. N/Y Ac. Sci.*, **834**, 673 (1977).
5. В. Б. Ритов, *Итоги науки и техники. Биологическая химия*, т. 11, Москва (1977), сс. 1 – 80.
6. F. Fidler, *Cancer. Res.*, **50**, 6130 – 6132 (1990).
7. K. Honn, F. Onoda, C. Diglio, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **174**, 16 – 17 (1983).
8. J. A. Schmank, A. M. Levfer, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 178 – 187 (1982).
9. В. П. Нифонтов, Л. В. Татьянаенко, В. А. Чернов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(5), 522 – 526 (1988).
10. Н. А. Санина, С. М. Алдошин, Т. Н. Руднева и др., *Координац. химия*, **31**, 301 – 306 (2005).
11. N. A. Sanina, S. M. Aldoshin, T. N. Rudneva, et al., *J. Mol. Structure*, **752**(1 – 3), 110 – 114 (2005).
12. O. A. Rakova, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin, et al., *Inorg. Chem. Comm.*, **6**, 145 – 148 (2003).
13. Н. А. Санина, О. С. Жукова, С. М. Алдошин, Н. С. Емельянова, Г. К. Герасимова, *Заявка на патент № РСТ/RU2007000285* (2007).
14. Р. Е. Либерзон, Т. Т. Школкина, О. С. Ватолкина, *Вопросы мед. химии*, **4**, 526 – 530 (1977).
15. Д. Бейли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1980), с. 53.
16. И. В. Березин, А. А. Клесов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, Моск. Универс., Москва (1973), сс. 77 – 84.
17. В. Б. Ритов, В. М. Мельгунов, П. Г. Комаров, *ДАН СССР*, **233**, 730 – 733 (1977).
18. N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, et al., *Nitric oxide: biology & chemist.*, **16**, 181 – 188 (2007).

Поступила 01.07.08

EFFECT OF NITROSYL IRON – SULFUR COMPLEXES ON THE ACTIVITY OF HYDROLYTIC ENZYMES

L. V. Tat'yanenko, A. I. Kotel'nikov*, O. V. Dobrokhotova, E. A. Saratovskikh, N. A. Sanina, T. N. Rudneva, and S. M. Aldoshin

Institute for Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Oblast, 142432, Russia

* e-mail: kotel@icp.ac.ru

We have studied the effect of some NO donors based on new sulfur-nitrosyl iron complexes, including the anionic thiosulfate complex $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I) and neutral thiolate complexes of the general formula $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$ with R = 1-methyl-imidazol-2-yl (II), 3-amino-1,2,4-triazol-5-yl (III), and phenyl (IV), on the enzymatic activity of two hydrolytic enzymes, namely, cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase (GMP PDEase) and Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum (SR Ca^{2+} ATPase). It has been found that all the tested compounds inhibit GMP PDEase and SR Ca^{2+} ATPase functioning in the 0.1 – 1 mM concentration range. Compounds I and II inhibit the activity of GMP PDEase with $K_i = 1$ μM and $K_i = 5$ μM , respectively. These compounds are more efficient than the reference drug nicorandil ($K_i = 0.1$ mM) used in clinical therapy. The inhibition of GMP PDEase function favors the accumulation of cyclic GMP, a secondary messenger in living organisms, which is responsible for vasodilatory, antiaggregant and antihypertensive properties of drugs. The inhibition of SR Ca^{2+} ATPase blocks the active transport of Ca^{2+} ions, thus affecting the equilibrium of Ca ions in the cells and the manifestation of the above pharmacological effects. The experimental data allow one to predict the mechanisms of action of chemical compounds under consideration as potential drugs.

Key words: cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase, Ca – ATPase sarcoplasmic reticulum, inhibitors, nitrosyl – iron – sulfur complexes.