

УДК 615.717

Динитрозильные комплексы железа — новый тип гипотензивных препаратов

А. А. Тимошин, Ц. Р. Орлова, А. Ф. Ванин, Н. А. Санина,
Э. К. Рууге, С. М. Алдошин, Е. И. Чазов

АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЕВИЧ ТИМОШИН — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава». Область научных интересов: экспериментальная кардиология, свободные радикалы, спектроскопия ЭПР. E-mail timoshin@cardio.ru

ЦВЕТИНА РОМАНОВНА ОРЛОВА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава». Область научных интересов: экспериментальная кардиология, физиология животных.

АНАТОЛИЙ ФЕДОРОВИЧ ВАНИН — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН. Область научных интересов: механизмы функционирования оксида азота в живых системах. E-mail vanin@polymer.chph.ras.ru

НАТАЛИЯ АЛЕКСЕЕВНА САНИНА — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом строения вещества Института проблем химической физики РАН. Область научных интересов: координационные соединения, металлокомплексы. E-mail sanina@icp.ac.ru

ЭННО КУСТАВИЧ РУУГЕ — доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химических методов исследования ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава». Область научных интересов: свободные радикалы, окислительный стресс, спектроскопия ЭПР. E-mail ruuge@mail.ru

СЕРГЕЙ МИХАЙЛОВИЧ АЛДОШИН — академик, доктор химических наук, директор Института проблем химической физики РАН, член Президиума РАН, координационных советов РАН по интеллектуальной собственности и по инновационной деятельности. Область научных интересов: кристалло- и бионеорганическая химия, связь структуры со свойствами, реакции в твердой фазе. E-mail sma@icp.ac.ru

ЕВГЕНИЙ ИВАНОВИЧ ЧАЗОВ — доктор медицинских наук, академик, Генеральный директор ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава». Область научных интересов: кардиология. E-mail rcardio-chazov@list.ru

121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А, ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава».

119992 Москва, Ленинские горы, Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, тел. (495) 939-29-73.

119991 Москва, ул. Косыгина, 4, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

142432 Московская обл., Черноголовка, просп. Акад. Семенова, 1, Института проблем химической физики РАН.

Введение

В настоящее время хорошо известно, что такое низкомолекулярное нестабильное соединение как монооксид азота в сердечно-сосудистой системе выполняет роль эндогенного вазодилатора, регулируя тонус сосудов. В течение многих лет доноры NO, вводимые в организм экзогенно, применяются в клинической практике для расширения кровеносных сосудов. К таким препаратам относятся широко известные лекарственные средства на основе органических нитратов, например нитроглицерин и его аналоги.

В настоящее время изучаются физиологические свойства и возможности применения других доноров NO, в частности динитрозильных комплексов железа с

различными лигандами (цистеин, глутатион, тиосульфат).

Известно, что квазистабильные парамагнитные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, находящиеся в растворе в ионной форме $\{(RS)_2Fe(NO)_2\}^+$, могут формироваться по L-аргинин-зависимому пути и накапливаться в клетках животных [1–5]. Наряду с другой формой эндогенных соединений монооксида азота — S-нитрозотиолами, динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут выполнять функцию защиты NO в организме животных и человека от губительного действия на него анионов супероксида, что обеспечивает депонирование NO, а также его внутри- и межклеточный транспорт [6, 7]. Вместе с тем динитрозильные комплексы железа как доноры

NO способны воздействовать на разнообразные физиологические процессы, вызывая гипотензию, ослабление кровеносных сосудов, подавление тромбообразования и т.д. [8, 9].

Динитрозильные комплексы железа парамагнитны и характеризуются специфическим сигналом ЭПР со средним значением g -фактора 2,03 [8—10]. Так, сигналы ЭПР этих комплексов были зарегистрированы при исследовании печени мышей после обработки их бактериальным липополисахаридом. В результате такой обработки в организме инициируется синтез одной из изоформ фермента, катализирующего образование NO из аминокислоты L-аргинина, — индуцибельной NO-синтазы, наиболее эффективно продуцирующей монооксид [10]. Однако и в таких экспериментальных условиях накопление комплекса затрудняется из-за деструктивного действия на него супероксидных радикалов, продуцирующихся NO-синтазой наряду с NO. Такое воздействие можно преодолеть, вводя животным тиосульфат, защищающий динитрозильные комплексы железа от супероксида и обеспечивающий накопление их до уровня, регистрируемого методом ЭПР [10].

Динитрозильные комплексы железа как доноры NO обладают мощной гипотензивной активностью [11—13]. При однократном введении анестезированым животным они вызывают длительную гипотензию, снимающуюся только после прекращения анестезирующего действия [11, 12]. У бодрствующих животных в аналогичных опытах наблюдается более быстрое восстановление кровяного давления [13]. Это объясняется тем, что в условиях бодрствования такое изменение обусловлено выбросом в кровь катехоламинов по механизму обратной связи, что может вызывать усиленную генерацию супероксида при участии соответствующих монооксигеназ, окисляющих катехоламины молекулярным кислородом [14]. В этом случае в результате повышения уровня активных форм кислорода содержание динитрозильных комплексов в организме снижается, и как следствие эффект гипотензии ослабляется.

Целью нашей работы было изучение стабильности таких экзогенных доноров NO, как динитрозильные комплексы железа с тиосульфатом в организме бодрствующих животных в условиях *in vivo*. Представляет также интерес исследование действия нетоксичных соединений, способных вывести эти комплексы из крови и ослабить физиологический эффект до необходимого уровня. Поэтому на фоне действия таких динитрозильных комплексов железа исследовался эффект, вызванный комплексом железа и N-метил-D-глюкаминдителиокарбата — вещества, эффективно взаимодействующего с динитрозильным комплексом железа в организме с образованием нетоксичных аддуктов NO, способных быстро выводиться из организма [15].

Методика эксперимента

Подготовка препаратов. Нитрозильный комплекс железа с тиосульфатом натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ получали по стандартной методике [16] путем кристаллизации продукта, синтезированного по реакции водного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в токе газообразного монооксида азота. Непосредственно

перед инъекцией полученные кристаллы растворяли в физиологическом растворе в присутствии 20-кратного избытка тиосульфата. В кристаллическом состоянии препарат представляет собой тетранитрозильный комплекс железа с лигандом тиосульфатом. При растворении в физиологическом растворе происходит быстрый распад его молекул на два динитрозильных комплекса. Образующиеся динитрозильные комплексы с тиосульфатом сохраняют стабильность в течение нескольких часов и дают сигнал ЭПР с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой, характерный для комплекса с тиолсодержащими лигандами [6].

N-метил-D-глюкаминдителиокарбат (МГД) синтезировали по методике [17]. Комплексы Fe^{2+} -МГД₂ получали введением $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в физиологический раствор, содержащий глюкаминдителиокарбат (при мольном соотношении $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} : \text{МГД} = 1 : 10$). При интенсивном встряхивании полученного раствора происходит быстрое окисление комплексов до состояния Fe^{3+} -МГД₂ (спиновая ловушка NO). Образование таких комплексов контролировали путем регистрации их спектров поглощения [15].

Другие вещества, необходимые для экспериментов, были получены от фирм Sigma и Aldrich.

Подготовка животных, экспериментальный протокол. Эксперименты проводили на кроликах (самки, 3—4 кг), содержащихся на стандартной диете. В начале каждого опыта (0 мин) с помощью катетера, вставленного в краевую вену уха животных, брали исходный образец крови. Затем в течение 1—2 мин внутривенно вводили раствор динитрозильного комплекса железа. Доза однократного введения: 6,5 мг сухого препарата $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 30 мг тиосульфата в 1,0 мл физиологического раствора. Далее в части опытов через 15 мин животным внутривенно вводили ловушку NO (200 мг МГД + 20 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 5,0 мл физиологического раствора), продолжительность инъекции 2 мин. На протяжении 4 ч после введения донора NO, а также через 48 ч у всех животных через катетер отбирали пробы венозной крови.

В контрольной серии опытов в кровь животных вводили только физиологический раствор. Образцы крови животных в этих случаях брали после инъекции как ловушки NO, так и эквивалентного количества физиологического раствора.

Во все образцы крови добавляли антикоагулянт гепарин (10—20 МЕ*/мл), после чего их сразу замораживали и хранили в жидком азоте. Размораживание производилось непосредственно перед регистрацией спектров ЭПР.

Для исследования содержания нитрозильных комплексов железа в плазме и эритроцитарной массе часть образцов крови после добавления гепарина центрифугировали, отделяли плазму от эритроцитов, после чего их также замораживали и хранили в жидком азоте. Размораживали непосредственно перед регистрацией спектров ЭПР.

Регистрация спектров ЭПР. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ЭПР X-диапазона типа E-109E (Varian, США) при комнатной температуре.

* Международная единица.

Амплитуда модуляции магнитного поля устанавливалась на уровне 0,2 мТл при частоте 100 кГц. Частота СВЧ-поля спектрометра составляла 9,15 ГГц, мощность — 10 мВт.

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее значение \pm средняя погрешность для 4—5 опытов.

Результаты и обсуждение

Исследование образцов крови животных контрольной группы показало, что как и в случае нативных кроликов, так и после инъекции им ловушки NO сигналы ЭПР от образцов крови в области $g = 2,03$ практически отсутствуют. Отметим, что аналогичные результаты были получены нами ранее [15].

Внутривенное введение животным низкомолекулярного динитрозильного комплекса железа с тиосульфатом сразу же вызывало появление сигнала ЭПР. На рис. 1 приведены характерные спектры этого комплекса в образцах цельной крови, а также в ее компонентах, полученных через 5 мин после инъекции. Видно, что формы этих сигналов в плазме и эритроцитах значительно различаются, а спектр цельной крови можно рассматривать как их суперпозицию. Амплитуду сигналов ЭПР оценивали с помощью параметра I_1 . Как видно из рис. 1, сигнал образцов плазмы существенно более интенсивный, чем от эритроцитарной массы. Следовательно, содержание парамагнитных динитрозильных комплексов железа в плазме выше, чем в эритроцитах.

Вероятно, что внутривенное введение животным низкомолекулярных комплексов с тиосульфатом сразу же приводит к связыванию их с белками крови, в основном с альбумином как доминирующим тиолсодержащим белком плазмы крови. Это подтверждается формой спектров ЭПР образцов крови, зарегистрированных после введения этих доноров NO. Полученные спектры идентичны описанным ранее спектрам ЭПР модельных систем, содержащих белковые динитрозильные комплексы железа [6]. Эти спектры характеризуются асимметричной формой, обусловленной анизотропией g -фактора, с центром в области $g = 2,03$. По форме и положению они совпадают с сигналами, регистрируемыми при 77 К [6]. Как было показано ранее, обладающие высокой подвижностью низкомолекулярные динитрозильные комплексы железа при комнатной температуре имеют симметричные узкие спектры с разрешенной сверхтонкой структурой при $g = 2,03$, что объясняется усреднением анизотропии их g -фактора в таких условиях [6]. Подвижность белковых динитрозильных комплексов при комнатной температуре существенно ниже, поэтому недостаточна для такого усреднения, вследствие чего их спектры ЭПР приобретают анизотропную форму. Вероятно, изменение формы спектров, регистрируемых при переходе от плазмы к эритроцитарной массе (см. рис. 1), можно объяснить также изменением характера движения связанных с белковыми лигандами молекул динитрозильных комплексов железа.

Очевидно, что образование белковых нитрозильных комплексов, наблюдаемых в наших опытах, происходит в результате переноса групп $\text{Fe}(\text{NO})_2^{3+}$ от низкомолекулярных комплексов на белковые лиганды. Как было показано в [18], в сывороточном альбумине

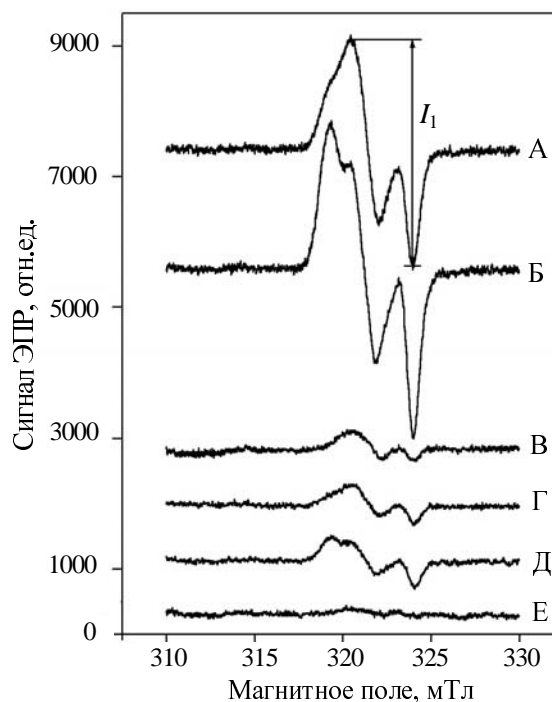


Рис. 1. Спектры ЭПР цельной крови (А, Г), плазмы (Б, Д) и эритроцитарной массы (В, Е), полученные через 5 мин (А, Б, В) и 48 ч (Г, Д, Е) после введения животному динитрозильного комплекса с тиосульфатом

в качестве таких лигандов выступают единственная в белке тиольная группа и нетиоловый лиганд, вероятно, остаток гистидина. Динитрозильные комплексы железа, связанные с альбумином, дают сигнал ЭПР с ромбической симметрией g -фактора со значениями 2,05, 2,03 и 2,014 [18]. При наличии в системе низкомолекулярных тиолсодержащих лигандов типа тиосульфата эти лиганды могут замещать гистидиновый лиганд в белковом нитрозильном комплексе. В результате первичные комплексы трансформируются в комплексы, спектры ЭПР которых характеризуются аксиальной симметрией g -фактора со значениями $g_{\perp} = 2,04$ и $g_{\parallel} = 2,014$ [18].

Именно такая трансформация происходит, вероятно, в данных экспериментальных условиях. Полученные в наших экспериментах спектры могут представлять собой суперпозицию сигналов ЭПР с ромбической и аксиальной симметрией g -фактора [19].

Нами установлено, что динитрозильные комплексы железа, связанные с белком, могут регистрироваться в кровотоке кролика в течение длительного времени. На рис. 1 представлены также спектры цельной крови, плазмы и эритроцитарной массы, полученные через 48 ч после инъекции донора NO. Амплитуды всех трех сигналов составляют 10—20% от соответствующих величин, характерных для начала эксперимента. Как форма спектров, так и соотношение их амплитуд, полученных для цельной крови и ее фракций, также существенно не изменяются на протяжении 48 ч эксперимента. Следовательно, вклады парамагнитного динитрозильного комплекса железа, связанного с белками, в плазме и эритроцитах существенно не менялись за весь период опыта, и характер их взаимодей-

ствия с белковыми лигандами также оставался практически неизменным.

Зависимости на рис. 2 демонстрируют характерную кинетику изменения амплитуды спектра ЭПР динитрозильного комплекса железа (I_1) в цельной крови в течение первых четырех часов после введения препарата (кривая А), когда его содержание в крови наибольшее, а животное все время находится в бодрствующем состоянии. Из рисунка видно, что в результате введения нитрозильного комплекса амплитуда сигнала сразу же достигает максимального значения, затем медленно уменьшается (не более 47% от максимального значения за четырехчасовой период эксперимента). Уменьшение сигнала может свидетельствовать о спонтанном разложении в крови комплекса с выделением NO, а также о выходе его из кровотока через почки.

Как было установлено в [20], в присутствии производных дитиокарбамата или особенно их комплексов с железом происходит эффективный распад введенных в организм животных динитрозильных комплексов, что приводит к образованию в организме парамагнитных моноснитрозильных комплексов железа с производными дитиокарбамата ($\text{NO-Fe}^{2+}\text{-МГД}_2$). Результаты аналогичных опытов, проведенных в данных экспериментальных условиях, согласуются с этими результатами.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР крови животных из экспериментальной группы, которым через 15 мин после инъекции динитрозильного комплекса железа с тиосульфатом внутривенно вводили ловушку NO — комплекс $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$. В результате введения этой ловушки NO амплитуда спектра динитрозильного комплекса в крови (I_1) заметно уменьшается с одновременным появлением трех дополнительных узких

линий (рис. 3, спектр Б). Такой триплетный сигнал, как известно, соответствует парамагнитному спиновому аддукту $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-МГД}_2$ [15, 21]. Следовательно, при введении в кровоток динитрозильного комплекса железа и $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$ инициируется эффективное образование этого аддукта. Это может быть результатом как захвата ловушкой NO в крови, так и прямого перехода монооксида азота от комплекса на молекулы ловушки без его выделения в кровь [20].

На рис. 2 (кривая Б) и 4 представлены, соответственно, усредненные кинетические кривые изменения амплитуды сигналов ЭПР динитрозильного комплекса (I_1) и $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-МГД}_2$ (I_2) в цельной крови животных, получавших инъекции как нитрозильного комплекса, так и $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$. Из рис. 2 видно, что после введения в кровь ловушки NO амплитуда сигнала I_1 уменьшалась на 73%. Из рис. 4 следует, что в течение ~70 мин в крови животного присутствовал аддукт $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-МГД}_2$. Далее он не регистрировался, и в спектрах образцов крови до конца опыта наблюдался только остаточный сигнал связанного с белком динитрозильного комплекса железа (рис. 3, спектр Г). Исходя из результатов нашей предыдущей работы [15], относительно быстрое исчезновение сигнала аддукта $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-МГД}_2$ можно объяснить тем, что это соединение удаляется через почки с мочой. Таким образом, применение комплексов железа с дитиокарбаматом ($\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$) является эффективным средством для удаления динитрозильного комплекса железа по крайней мере из крови, что несомненно уменьшает его физиологическое действие на организм.

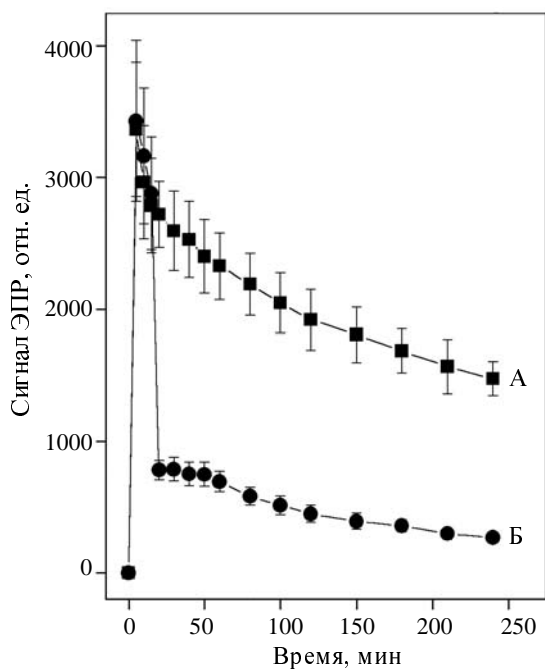


Рис. 2. Кинетические кривые изменения амплитуды сигналов ЭПР (I_1) динитрозильных комплексов железа:

А — животные, получавшие комплекс с тиосульфатом; Б — последующее введение $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$

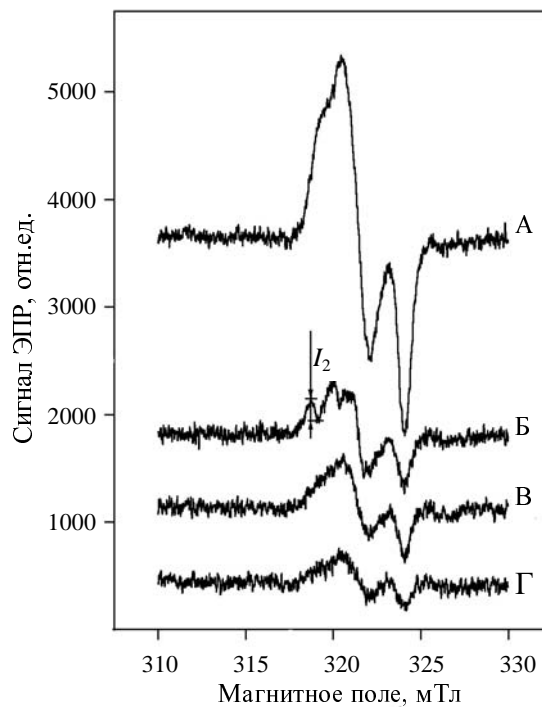


Рис. 3. Влияние инъекции ловушки NO ($\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$) на спектр ЭПР цельной крови кролика, содержащей динитрозильный комплекс железа с тиосульфатом.

Инъекцию $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$ производили через 15 мин после введения комплекса. Спектры зарегистрированы через 13 мин (до инъекции $\text{Fe}^{3+}\text{-МГД}_2$) (А), 20 (Б), 80(В), 180 мин (Г) после введения комплекса

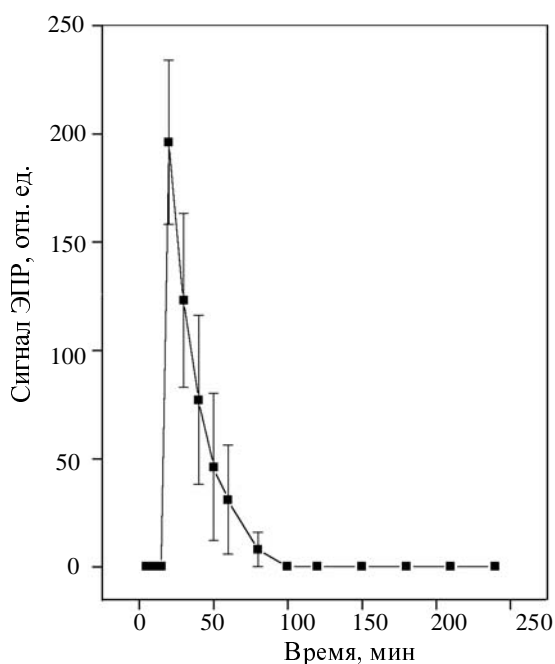


Рис. 4. Кинетическая кривая изменения амплитуды низко-польной компоненты сигналов ЭПР NO-Fe²⁺-МГД₂ (I₂) в крови кролика.

Через 15 мин после введения животным динитрозильного комплекса железа с тиосульфатом производили инъекцию Fe³⁺-МГД₂

Следовательно, стабильный динитрозильный комплекс железа с тиосульфатом, введенный внутривенно в организм, связывается с белковыми молекулами и присутствует в кровотоке в течение длительного времени (более двух суток), причем в плазме крови содержание его парамагнитной формы существенно выше, чем в эритроцитах. При последующем введении в кровь спиновой ловушки NO (Fe³⁺-МГД₂) происходит деструкция значительной части динитрозильных комплексов железа. Продукты их распада удаляются из кровотока в течение часа.

Таким образом, динитрозильные комплексы железа с тиосульфатом могут послужить основой для создания нового типа лекарств — доноров монооксида азота, сохраняющихся длительное время в организме и вызывающих мощное гипотензивное действие.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 05-04-49751а, 4-03-08108 и 05-04-49383).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lancaster J.R., Hibbs J.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, v. 87, p. 1223—1227.
2. Drapier J.-C., Pellat C., Henry Y. J. Biol. Chem., 1991, v. 266, p. 10162—10167.
3. Geng Y.-L., Petersson A.-S., Wennmalm A., Hansson G. Exp. Cell. Res., 1994, v. 214, p. 418—424.
4. Mulsch A., Mordvintcev P., Vanin A., Busse R. Biochim. Biophys. Res. Comm., 1993, v. 196, p. 1303—1308.
5. Stadler J., Bergonia H.A., DiSilvio M., Sweetland M.A., Biliyar T.R., Simmons R.L., Lancaster J.R. Arch. Biochim. Biophys., 1993, v. 302, p. 4—11.
6. Vanin A.F., Kleschyov A.L. In: Nitric Oxide Transplant Rejection and Anti-Tumor Defense. Eds. S. Lukiewicz, J.L. Zweier. Kluwer Acad. Press, 1998, p. 49—82.
7. Muller B., Kleschyov A.L., Alencar J.L., Vanin A.F., Stoclet J.-C. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 2002, v. 962, p. 131—139.
8. Ванин А.Ф. Биофизика, 2004, т. 49, № 4, с. 581—586.
9. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Биохимия, 2004, т. 69, № 5, с. 699—705.
10. Микоян В.Д., Серезженков В.А., Бражникова Н.В., Кубрина Л.Н., Хачатрян Г.Н., Ванин А.Ф. Биофизика, 2004, т. 49, № 1, с. 121—127.
11. Kleschyov A.L., Mordvintcev P.I., Vanin A.F. Studia biophysica, 1985, v. 105, p. 93—102.
12. Мордвицев П.И., Путищев М.Д., Галаган М.Е., Орановская Е.В., Медведев О.С., Ванин А.Ф. Бюлл. Всесоюз. кардиологического научного центра АМН СССР, 1988, № 1, с. 46—51.
13. Галаган М.Е., Орановская Е.В., Мордвицев П.И., Медведев О.С., Ванин А.Ф. Там же, 1988, № 2, с. 75—80.
14. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Изд. Мир, 1993, с. 225—226.
15. Тимошин А.А., Орлова Ц.Р., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. Биофизика, 2005, т. 50, № 3, с. 537—543.
16. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N., Golovina N.I., Shilov G.V., Shul'ga Yu.M., Martynenko V.M., Ovanesyan N.S. Russian Journal of Coordination Chemistry, 2005, v. 31, № 5, p. 301—306.
17. Shinobu L.A., Jones S.G., Jones M.M. Acta Pharmacol. Toxicol., 1984, v. 54, p. 189—194.
18. Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V. Nitric Oxide: Biol & Chem., 1998, v. 2, p. 224—234.
19. Ванин А.Ф., Блюменфельд Л.А., Четвериков А.Г. Биофизика, 1967, т. 12, № 5, с. 829—838.
20. Ueno T., Suzuki Y., Fujii S., Vanin A.F., Yoshimura T. Biochem. Pharmacol., 2002, v. 63, p. 485—493.
21. Vanin A.F., Huisman A., van Faassen E.E. In: Methods in Enzymology, 2003, v. 359, p. 27—42.