

УДК 577.3

## ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ЛИГАНДОМ НА ОСНОВЕ *N*-АЦЕТИЛ-*L*-ЦИСТЕИНА ПРИ СУБЛИНГВАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЭТИХ КОМПЛЕКСОВ В ОРГАНИЗМ КРЫС

© 2022 г. А.А. Тимошин\*, К.Б. Шумаев\*. \*\*, В.Л. Лакомкин\*, А.А. Абрамов\*, Э.К. Рууге\*. \*\*\*

\*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

\*\*Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2

\*\*\*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: timoshin\_a\_a@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2022 г.

После доработки 16.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Проанализировано действие такой стабилизированной формы NO, как динитрозильные комплексы железа с лигандом на основе *N*-ацетил-*L*-цистеина, при сублингвальном введении данного соединения в организм крыс. Методом ЭПР установлено, что в результате его введения в ткани печени регистрируется образование и накопление комплексов динитрозильные комплексы железа с белковыми лигандами. Кроме того, в результате действия динитрозильных комплексов железа с *N*-ацетил-*L*-цистеином регистрируется достоверное увеличение общего уровня NO в ткани сердца и печени, причем наиболее существенный эффект установлен для печени животного.

*Ключевые слова:* *N*-ацетил-*L*-цистеин, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, спиновая ловушка, сублингвальное введение, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302922030188, EDN: APOAII

Известно, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами являются одной из основных природных форм депонирования NO в биосистемах [1–9]. Такие стабилизированные формы NO обеспечивают перенос и накопление NO в организме, а в результате их распада происходит высвобождение NO, S-нитрозотиолов и ионов двухвалентного железа [7, 8]. Известно также, что ДНКЖ обладают собственным антиоксидантным и цитопротекторным действием [4, 10–13], а также могут являться природным регулятором уровня NO в органах и тканях [14].

Известно также, что ДНКЖ с низкомолекулярными тиолсодержащими лигандами (глутатионом, цистеином) могут быть сравнительно просто синтезированы в лабораторных или промыш-

ленных условиях для их последующего введения в организм. Ранее нами в работах [15, 16] были представлены данные о действии ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-Глт) при различных способах введения этого комплекса в организм. Установлено, что формирование ДНКЖ с белковыми лигандами в крови и их гипотензивное действие регистрируются в тех случаях, когда ДНКЖ-Глт вводился в организм путем инъекции, а именно внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно и внутримышечно.

В данной работе предпринята попытка анализа биологической активности препарата ДНКЖ, в котором тиолсодержащим лигандом является *N*-ацетил-*L*-цистеин (ДНКЖ-Ацц). Известно, что данное соединение является нетоксичным и широко используется как муколитическое средство, которое легко проникает через клеточные мембраны. Можно предположить, что аналогичными свойствами будет обладать и ДНКЖ-Ацц. Ранее нами уже было показано, что данные амфифильные комплексы и/или продукты их полураспада проникают в организм в результате трансдермального [17] или ингаляционного [18] вве-

*Сокращения:* ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Глт – динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДНКЖ-Ацц – динитрозильные комплексы железа с *N*-ацетил-*L*-цистеином, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, АД – артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений, Fe-DETC<sub>2</sub> – комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата.

дения, и выступают как источники NO в органах и тканях.

Целью данной работы является анализ действия такой стабилизированной формы NO, как ДНКЖ-Ацц, при сублингвальном введении данного соединения в организм крыс.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтез препарата ДНКЖ-Ацц проводили в лабораторных условиях в соответствии с методикой, описанной нами ранее [17]. Формирование данных комплексов, как и ранее, контролировали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [17]. Далее полученный водный раствор этого соединения замораживали, хранили в жидком азоте и размораживали непосредственно перед началом эксперимента. После размораживания в него добавляли глицерин, конечная концентрация которого составляла 20%.

Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar (самцы массой 350–450 г). Животных содержали в биоклинике НМИЦ кардиологии Минздрава России в клетках по пять особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировался в режиме 12 ч : 12 ч (свет : темнота) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

В начале опыта крыс анестезировали препаратом Золетил-100 (5 мг/кг массы тела). Далее для регистрации среднего артериального давления (АД<sub>ср</sub>) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) животным в левую сонную артерию вводили полиэтиленовый катетер PE-50, который подключали к манометрическому датчику P23 Db (Gould Statham, США). Полученный сигнал АД через усилитель «Biograph-4» (СПбГУ аэрокосмического приборостроения, Россия) подавали на АЦП NI-USB 6210 (National Instruments, США) и обрабатывали на компьютере с помощью специальных программ записи и обработки сигналов физиологических параметров работы сердца (автор – Е.В. Лукошкова). Через тот же катетер проводили забор образцов крови после введения животным препарата ДНКЖ-Ацц.

Далее всех животных делили на две экспериментальные группы по пять-шесть особей в каждой. Животные из первой группы получали ДНКЖ-Ацц в глицерине путем сублингвального введения. В этом случае данный препарат вводили в ротовую полость или в защечный мешок капельно с помощью инсулинового шприца с тупой иглой в течение 35–40 мин. Общий объем препарата ДНКЖ-Ацц составлял 1.0 мл, а его доза была стандартной и составляла 5.0 мкмоль из расчета на одно животное. В другую группу входили контрольные животные, которым данный препарат не вводили. В ходе экспериментов у крыс реги-

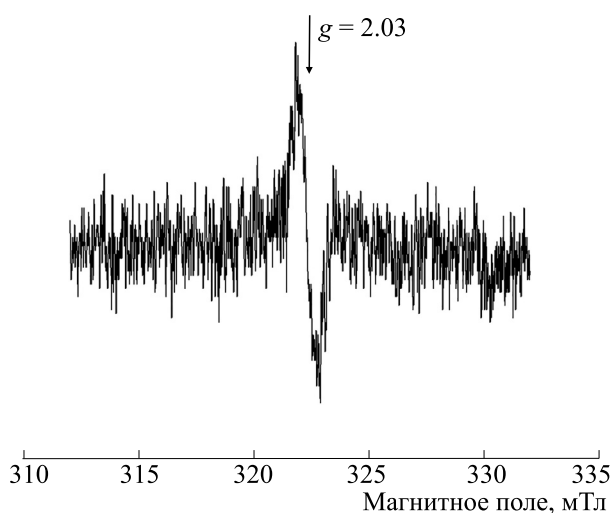
стрировали АД<sub>ср</sub> и ЧСС, причем как до, так и в течение одного часа после введения ДНКЖ-Ацц.

Далее в половине опытов животных забивали передозировкой уретана, после чего у них забирали образцы ткани органов (сердце, легкое, печень, почка, скелетная (бедренная) мышца), а также цельной крови. Полученные образцы помещали в пластиковые трубки диаметром 5.0 мм, которые сразу же замораживали, хранили в жидком азоте и использовали для регистрации их спектров ЭПР.

В других опытах в обеих экспериментальных группах методом ЭПР проводили исследование общего уровня NO в ткани органов. Для этого применяли липофильные спиновые ловушки оксида азота, такие как комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC<sub>2</sub>), с регистрацией образующихся спиновых аддуктов NO-Fe-DETC<sub>2</sub> методом ЭПР. При этом животным через 1 ч после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц путем инъекций вводили компоненты этой спиновой ловушки NO – диэтилдитиокарбамат (DETC, 620 мг/(кг массы тела) в 1.0 мл физиологического раствора, внутривенно) и FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O с цитратом натрия (25 и 125 мг/(кг массы тела) соответственно в 1.0 мл физиологического раствора, подкожно в область левого плеча). Далее через 20 мин животных забивали и изолировали их сердце, легкие, печень, почки и скелетную (бедренную) мышцу. Эти органы сразу промывали в физиологическом растворе и измельчали механически. Образцы размельченной ткани этих органов помещали в пластиковые трубки диаметром 5.0 мм, которые сразу же замораживали, хранили в жидком азоте и использовали для регистрации их спектров ЭПР.

Спектры ЭПР синтезированных ДНКЖ-Ацц в водной среде регистрировали при комнатной температуре в стеклянных капиллярах. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0.4 мТл. При этом мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра всегда устанавливали на уровне 10 мВт при частоте 9.14 ГГц. Сканирование магнитного поля, как и ранее (см. работу [17]), осуществляли с центром при  $g = 2.03$ .

Спектры ЭПР всех полученных образцов ткани органов регистрировали на ЭПР-спектрометре X-диапазона E-109E (Varian, США) при температуре жидкого азота. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0.4 мТл (при исследовании образцов ткани органов и крови без Fe-DETC<sub>2</sub>) или 0.2 мТл (при регистрации сигналов спиновых аддуктов в ткани) при частоте 100 кГц. Мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра устанавливали на уровне 10 мВт, его частота составляла 9.33 ГГц. Сканирование магнитного поля при записи сигналов ЭПР таких образцов осуществляли с цен-



**Рис. 1.** Спектр ЭПР синтезированных комплексов ДНКЖ-Ацц в водном растворе при комнатной температуре.

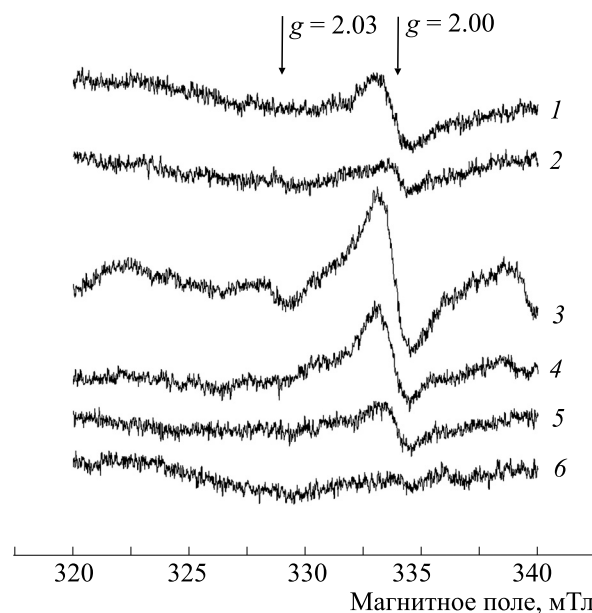
тром при  $g = 2.03$ . После записи сигналов все образцы размораживали и определяли массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра.

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием пакета программ Origin 8 (OriginLab Corporation, США). Все данные в статье представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее пяти-шести экспериментов. Для проверки статистической достоверности эффектов использовали двусторонний  $t$ -критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов в лабораторных условиях проводили синтез препарата ДНКЖ-Ацц и исследовали его действие при сублингвальном введении в организм крыс. На рис. 1 представлен спектр ЭПР полученного соединения при комнатной температуре. Видно, что он представляет собой асимметричный синглетный сигнал с центром при  $g = 2.03$ , характерный для данных соединений и описанный ранее в работах многих авторов [7, 8, 17].

В другой части работы в ходе всего опыта проводили мониторинг параметров АД<sub>ср</sub> и ЧСС. Установлено, что в исходном состоянии (до введения ДНКЖ-Ацц) АД<sub>ср</sub> составляло  $137 \pm 6$  мм рт. ст., а ЧСС —  $394 \pm 27$  уд./мин. Через 5 мин после начала закапывания данного препарата под язык обычно наблюдали небольшой подъем АД<sub>ср</sub> (до  $156 \pm 8$  мм рт. ст.), при этом ЧСС немного падала (до  $378 \pm 29$  уд./мин). Через 10–15 мин от начала введения ДНКЖ-Ацц АД<sub>ср</sub> возвращалось к



**Рис. 2.** Спектры ЭПР замороженных образцов ткани органов и цельной крови крыс, полученных через 1 ч после сублингвального введения препарата ДНКЖ-Ацц: 1 – сердце, 2 – легкое, 3 – печень, 4 – почка, 5 – скелетная мышца, 6 – кровь. Температура – жидкий азот.

норме, а уже начиная с 40-й минуты немного снижалось, достигая  $135 \pm 7$  мм рт. ст. на 50-й минуте и  $123 \pm 10$  мм рт. ст. на 60-й минуте эксперимента. ЧСС при этом повышалось до  $426 \pm 28$  уд./мин.

Следовательно, в ходе опытов регистрировались лишь небольшие изменения АД<sub>ср</sub> и ЧСС, но никаких достоверных изменений величин этих параметров в результате введения ДНКЖ-Ацц не обнаружено, таким образом, оно не оказывало заметного влияния на общую гемодинамику организма. Вероятно, при таком способе введения препарата не происходит существенного увеличения уровня свободного NO и/или его стабилизированных форм в кровотоке животного, из-за чего выраженный гипотензивный эффект также отсутствует. Вместе с тем нельзя исключить, что при сублингвальном введении ДНКЖ-Ацц его перенос в организме в значительной степени осуществляется лимфотоком [16, 17], а в кровотоке содержание этих комплексов и/или вторичных продуктов их распада невелико и недостаточно для инициирования заметного снижения среднего АД.

Кроме того, проводили анализ ткани органов и цельной крови методом ЭПР, при этом исследовались образцы, замороженные через 1 ч после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц экспериментальным животным. Характерные спектры ЭПР исследуемых образцов представлены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что в образцах

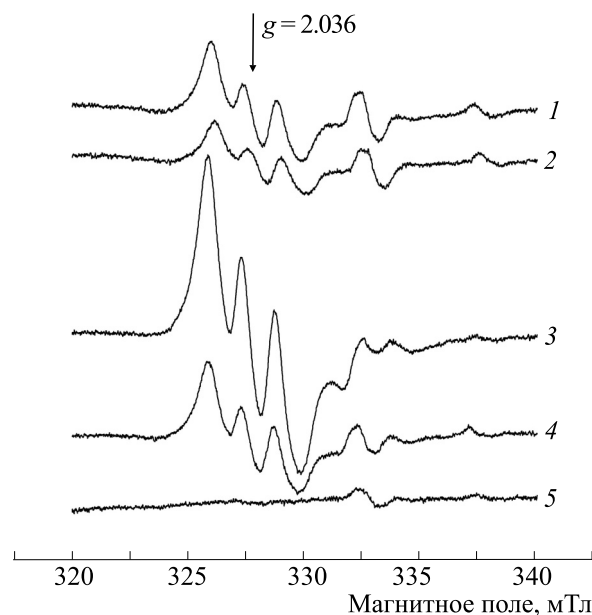
ткани регистрировались свободнорадикальные сигналы ( $g = 2.00$ ), которые представляют собой суперпозицию спектров убисемихинона и флаво-семихинонов [19].

Из рис. 2 также видно, что в спектре замороженной ткани печени (сигнал 3) при  $g = 2.03$  регистрировалась компонента, соответствующая ДНКЖ с белковым тиолсодержащим лигандом, в то время как на других спектрах на этом рисунке она отсутствовала. При этом в контрольной группе животных такие компоненты при  $g = 2.03$  также отсутствовали в образцах сердца, легких, почки и скелетной мышцы, а в пробах ткани печени при  $g = 2.03$  наблюдали лишь очень слабый сигнал, соответствующий базальным ДНКЖ с белковыми лигандами (данные не приведены), который был существенно меньше, чем наблюдаемый в этом органе после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц (спектр 3, см. рис. 2). Полученный результат заставляет думать о том, что в результате такого введения ДНКЖ-Ацц происходит превращение этих комплексов в ДНКЖ, связанные с белками, и накопление последних в ткани печени, в то время как в других исследуемых органах такие соединения не регистрируются.

Из этого рисунка также видно, что после введения ДНКЖ-Ацц в спектре крови сигнал при  $g = 2.03$  отсутствовал, что может свидетельствовать об отсутствии регистрируемого количества парамагнитных ДНКЖ в кровотоке. Кроме того, в этом случае не регистрировался сигнал от комплексов NO с железом гемовой группы гемоглобина (нитрозилHb) [3], что может указывать на отсутствие избытка свободного NO в кровотоке после введения ДНКЖ-Ацц.

В другой части работы в обеих экспериментальных группах проводили оценку общего уровня NO с применением метода ЭПР и использованием спиновой ловушки Fe-DETC<sub>2</sub>. Как известно [20], эта ловушка обладает гидрофобными свойствами и способна эффективно взаимодействовать как со свободным NO, так и с его депонированными формами, с образованием стабильных парамагнитных спиновых аддуктов NO-Fe-DETC<sub>2</sub>, регистрируемых методом ЭПР.

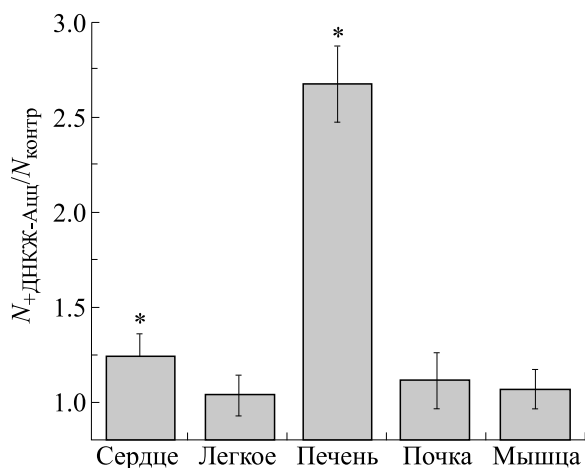
На рис. 3 представлены характерные спектры ЭПР образцов ткани исследуемых органов, полученных через 20 мин после введения компонентов этой ловушки в организм. Из этого рисунка видно, что в исследуемых образцах также регистрировали свободнорадикальные сигналы ЭПР, а также компоненты, принадлежащие комплексам молибдена в высокопольной части спектров. Следует отметить, что во всех случаях в спектрах



**Рис. 3.** Спектры ЭПР замороженных образцов ткани органов крыс, полученных через 20 мин после введения животным компонентов спиновой ловушки Fe-DETC<sub>2</sub>, т.е. через 1 ч 20 мин после введения препарата ДНКЖ-Ацц: 1 – сердце, 2 – легкое, 3 – печень, 4 – почка, 5 – скелетная мышца. Температура – жидкий азот.

присутствовали узкие эквидистантные триплетные сигналы, принадлежащие спиновым аддуктам NO-Fe-DETC<sub>2</sub> ( $g = 2.036$ ). Содержание этих мононитрозильных комплексов, как отмечалось выше, отражает уровень NO, включая его депонированные формы.

Исходя из этих сигналов, оценивали содержание NO-Fe-DETC<sub>2</sub> во всех образцах ткани как количество парамагнитных центров в образце с нормировкой на массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра. Для оценки эффекта вводимого сублингвально ДНКЖ-Ацц на общий уровень NO в ткани органов, на рис. 4 представлены значения содержания NO-Fe-DETC<sub>2</sub>, соответствующие животным, получавшим ДНКЖ-Ацц (параметр  $N_{+ДНКЖ-Ацц}$ ) с нормировкой на аналогичные параметры, соответствующие контрольной группе ( $N_{контр}$ ). Из этого рисунка видно, что в результате действия ДНКЖ-Ацц во всех органах экспериментальных животных регистрировалось увеличение общего уровня NO. При этом для сердца и печени данные различия являются достоверными, а наиболее существенный эффект наблюдался для ткани печени животного.



**Рис. 4.** Значения содержания парамагнитных спиновых аддуктов NO-Fe-DETC<sub>2</sub> в образцах ткани органов животных (параметр  $N_{+ДНКЖ-Ащц}$ ), получавших препарат ДНКЖ-Ащц, с нормировкой на аналогичные величины, соответствующие контрольным животным ( $N_{контр}$ ); \* –  $p < 0.05$  по сравнению с величиной данного отношения, равной единице.

Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с данными более ранней работы [17], где было показано, что вводимые крысам трансдермально ДНКЖ-Ащц приводили к незначительному снижению АД<sub>ср</sub>, но вызывали рост общего уровня NO в ткани легких и печени. В то же время полученный эффект ДНКЖ-Ащц существенно отличался от действия вводимого с помощью инъекций ДНКЖ-Глт, которые оказывали выраженное гипотензивное действие [15, 16].

Таким образом, препарат ДНКЖ-Ащц, как стабилизированная форма NO, может осуществлять перенос NO в организм при его сублингвальном введении. В результате его введения в ткани печени регистрируется образование и накопление комплексов ДНКЖ с белковыми лигандами. Кроме того, в результате действия ДНКЖ-Ащц регистрируется достоверное увеличение общего уровня NO в ткани сердца и печени, причем наиболее существенный эффект установлен для печени животного.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. А.Ф. Ванину за ценные советы.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были выполнены в соответствии с директивой 2010/63/eu Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и принципами национального стандарта ГОСТ Р 53434-2009.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y.-J. Chen, W.-C. Ku, L.-T. Feng, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (33), 10929 (2008).
2. C.-H. Ke, C.-H. Chen, M.-L. Tsai, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **139** (1), 67 (2017).
3. K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, A. A. Timoshin, et al., *Methods Enzymol.* **436**, 445 (2008).
4. K. B. Shumaev, A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, et al., *BioFactors* **44** (3), 237 (2018).
5. Y. Suryo Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., *J. Biol. Chem.* **287** (10), 6960 (2012).
6. M.-L. Tsai, C.-C. Tsou, and W.-F. Liaw, *Acc. Chem. Res.* **48**, 1184 (2015).
7. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
8. A. F. Vanin, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **54**, 15 (2016).
9. S.-C. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55** (18), 9383 (2016).
10. А. А. Тимошин, Д. Ю. Дроботова, О. В. Циктишвили и др., *Докл. РАН* **432** (3), 416 (2010).
11. К. Б. Шумаев, А. А. Губкин, С. А. Губкина и др., *Биофизика* **51** (3), 472 (2006).
12. К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская, Д. И. Грачев и др., *Биомед. химия* **67** (2), 162 (2021).
13. К. Б. Шумаев, А. А. Губкин, В. А. Сerezhenkov, et al., *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **18**, 37 (2008).
14. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., *Биофизика* **64** (1), 108 (2019).
15. А. А. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 525 (2015).
16. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **162** (8), 169 (2016).
17. А. А. Тимошин, К. Б. Шумаев, В. Л. Лакомкин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **170** (9), 290 (2020).
18. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., *Биофизика* **66** (1), 183 (2021).
19. А. А. Timoshin, O. I. Pisarenko, V. L. Lakomkin, et al., *Exp. Clin. Cardiol.* **5** (2), 59 (2000).
20. A. F. Vanin and A. A. Timoshin, In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, New York, 2011), Vol. 704, pp. 135–149.

## Action of Dinitrosyl Iron Complexes with *N*-Acetyl-L-Cysteine-Bearing Ligand after Sublingual Administration in Rats

A.A. Timoshin\*, K.B. Shumaev\*, \*\*, V.L. Lakomkin\*, A.A. Abramov\*, and E.K. Ruuge\*, \*\*\*

\*Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

\*\*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

\*\*\*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The objective of this research was to study action of a stabilized NO form of dinitrosyl iron complexes with *N*-acetyl-L-cysteine-bearing ligand after sublingual administration in rats. By means of EPR spectroscopy, it was found that sublingual administration led to the formation and accumulation of dinitrosyl iron complexes with protein ligands in rat liver tissues. Furthermore, dinitrosyl iron complexes with *N*-acetyl-L-cysteine caused a significant increase in the total NO level in heart and liver tissues of rats but demonstrated a more pronounced effect in the animal liver.

*Keywords: N-acetyl-L-cysteine, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, spin trap, sublingual administration, electron paramagnetic resonance*