

УДК 541.49+546.562

К. А. ТИМОФЕЕВА^{1,2}, Н. В. ЛОГИНОВА^{1,2}, Я. В. ФАЛЕТРОВ^{1,2},
М. Ю. ГВОЗДЕВ², Н. П. ОСИПОВИЧ², Г. А. КСЕНДЗОВА²ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЦИТОХРОМОМ С
РЕДОКС-АКТИВНЫХ ДИГИДРОКСИБЕНЗОЛОВ
И ИХ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С Ni(II)¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь²НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Редокс-взаимодействие феррицитохрома *c* (Fe(III)–Cyt *c*) из сердечной мышцы быка с несколькими циклоаминометильными производными *орто*- и *мета*-дигидроксибензола (HL^I – HL^{IV}) и их редокс-активными комплексными соединениями с Ni(II) (NiL₂), которые проявляют высокую антимикробную активность, изучено спектрофотометрическим методом *in vitro* с целью оценки их антиоксидантной активности. Экспериментально подобраны условия, необходимые для реализации редокс-взаимодействия данного фермента и исследованных соединений: pH, буфер и концентрация компонентов реакционной смеси. Это позволило разработать методику определения скорости восстановления Fe(III)–Cyt *c* этими соединениями как критерия оценки их антиоксидантной активности. Наиболее высокие скорости восстановления фермента характерны для производных *орто*-дигидроксибензола – $(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-9} \div (9,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$ моль/мин; скорость восстановления *мета*-производных не превышает $(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$ моль/мин. Установлено, что скорость восстановления Fe(III)–Cyt *c* комплексными соединениями NiL₂ составляет $(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-9} \div (1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$ моль/мин.

Redox interaction of bovine heart ferricytochrome *c* (Fe(III)–Cyt *c*) with several cycloaminomethyl derivatives of *ortho*- and *meta*-dihydroxybenzenes and their Ni(II) coordination compounds (NiL₂), which demonstrate a high antimicrobial activity, was investigated *in vitro* spectrophotometrically in order to evaluate their antioxidant ability. The conditions (pH, a buffer and concentrations of the reaction mixture components) necessary to realize the redox interaction of the enzyme and the compounds under study were chosen experimentally, which made it possible to develop a procedure of estimating the rate of the Fe(III)–Cyt *c* reduction with these compounds as a criterion for evaluation of antioxidant activity. It was found that *ortho*-derivatives possess the highest rate of enzyme reduction equal to $(4.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-9} \div (9.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-9}$ mol/min; the rate of the process with the *meta*-derivatives does not exceed $(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-11}$ mol/min. The rate of Fe(III)–Cyt *c* reduction with NiL₂ coordination compounds is $(2.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-9} \div (1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-10}$ mol/min.

Ключевые слова: комплексные соединения Ni(II); циклоаминометильные производные дигидроксибензола; цитохром *c*; редокс-процесс; спектрофотометрия.

Keywords: Ni(II) coordination compounds; cycloaminomethyl derivatives of dihydroxybenzene; cytochrome *c*; redox process; spectrophotometry.

Способность участвовать в радикальных и редокс-процессах *in vivo* характерна для многих антимикробных агентов. Так, образование активных форм кислорода является основным механизмом действия противопаразитарных препаратов на основе нафтохинонов [1]. Высокая антифунгальная активность комплексных соединений 1,10-фенантролина с переходными металлами связывается со способностью инициировать окислительный стресс, нарушать работу митохондрий, замедлять синтез цитохромов *b* и *c* и разобщать процессы клеточного дыхания [2]. Литературные данные указывают на существование зависимости между антимикробными и антиоксидантными свойствами биологически активных соединений [3]. На основании этих данных сделано предположение о том, что комплексные соединения металлов, способные участвовать в редокс-процессах и воздействовать на электронтранспортные системы клетки, будут перспективны для поиска потенциальных химиотерапевтических агентов. Таким образом, оценка антиоксидантных (восстановительных) свойств этих агентов становится одним из ключевых этапов фармацевтической разработки новых антимикробных средств, отличающихся механизмом действия от стандартных антибиотиков. Реализация этого этапа невозможна без методик, обоснованных с учетом химической природы и свойств исследуемых соединений.

Сегодня известно несколько методов оценки восстановительной способности тестируемых биоактивных соединений. Очевидно, что один из основных физико-химических методов – циклическая вольтамперометрия, позволяющая количественно сравнивать в рядах однотипных соединений их устойчивость к окислению и восстановительные свойства, в частности на основании величин потенциалов первого пика окисления [4]. Для исследования восстановительной (антиоксидантной) активности биологически активных веществ *in vitro* также используются: метод оценки хелатирующей активности Fe(II) [5], ORAC – Oxygen Radical Absorption Capacity [6], TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity [7], FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power [8]. Следует отметить, что метод FRAP, основанный на способности молекулы антиоксиданта восстанавливать Fe(III) до Fe(II), имеет значительное преимущество по сравнению с остальными методами, так как подобно электрохимическому методу позволяет напрямую оценить восстановительную способность соединений. Однако метод FRAP не применим для оценки антиоксидантной активности комплексных соединений переходных металлов, поскольку используемые в нем цианид-анионы (хелатирующие агенты для ионов железа) разрушают исследуемые образцы.

В соответствии с результатами наших предыдущих исследований [9] для изучения восстановительной способности комплексных соединений переходных металлов принципиальное значение имеет также и выбор соединения-акцептора электронов. Это соединение не должно участвовать в комплексообразовании с ионами металла или нарушать стабильность комплексного соединения. Предпочтительное соединение-акцептор в редокс-процессе с участием ком-

плексных соединений – феррицитохром *c* (Fe(III)–Cyt *c*). При этом важным аргументом при выборе этого соединения-акцептора является то, что бактериальные цитохромы – одна из основных биомишеней антимикробных препаратов [10]. Их взаимодействия с бактериальными цитохромами *c* могут иметь существенное значение для развития фармакологических эффектов, обуславливающих резистентность или чувствительность к ним бактерий. Эти ферменты стабильны в широком диапазоне рН и ионной силы раствора, а изменение степени окисления Fe(III)–Cyt *c* хорошо определяется спектрофотометрическим методом. Вышеперечисленные факты создали необходимые условия для разработки методики исследования редокс-взаимодействия этого фермента с комплексными соединениями металлов.

Ранее нами показано, что к числу перспективных объектов для фармацевтической разработки с оценкой их антиоксидантной способности относятся циклоаминометильные производные дигидроксибензола и их комплексные соединения с Ni(II), которые обладают практически значимым уровнем антибактериальной и антифунгальной активности [9, 11–13]. Цель данной работы – разработка методики оценки их восстановительной (антиоксидантной) активности на основании определения скорости восстановления ими Fe(III)–Cyt *c*. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие основные задачи: определить оптимальные концентрации компонентов в реакционной смеси, подобрать оптимальное значение рН и состав буфера, обеспечивающие устойчивость компонентов реакционной смеси в процессе их взаимодействия. На основании полученных данных о скорости восстановления Fe(III)–Cyt *c* исследованными соединениями *in vitro* нужно было сравнить их восстановительную (антиоксидантную) активность, что важно для дальнейшей фармацевтической разработки.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследована восстановительная активность 3-(4-метилпиперазинометил)-5-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола (HL^I), 3-(4-метилпиперазинометил)-4,6-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксибензола (HL^{II}), 3-(4-метилпиперазинометил)-5-тритил-1,2-дигидроксибензола (HL^{III}), 2-(4-метилпиперазинометил)-4,6-ди-*трет*-бутил-1,3-дигидроксибензола (HL^{IV}) (рис. 1) и их комплексных соединений с Ni(II) с использованием биохимической методики.

Физико-химические свойства соединений HL^I – HL^{IV} описаны в монографии [11]. Синтез комплексов Ni(L^I)₂ – Ni(L^{IV})₂ выполнен по методике [12]. Ранее нами было установлено, что комплексные соединения никеля(II) имеют аморфную структуру, являются неэлектролитами и липофильными соединениями ($\lg P_{ow} = 2,2–3,3$); они устойчивы в водно-органических средах ($\lg \beta = 15–18$) и при нагревании до 150 ± 10 °С. Показано, что геометрия их координационного узла [NiO₂N₂] – плоскоквадратная с тетраэдрическим искажением [13] (рис. 2).

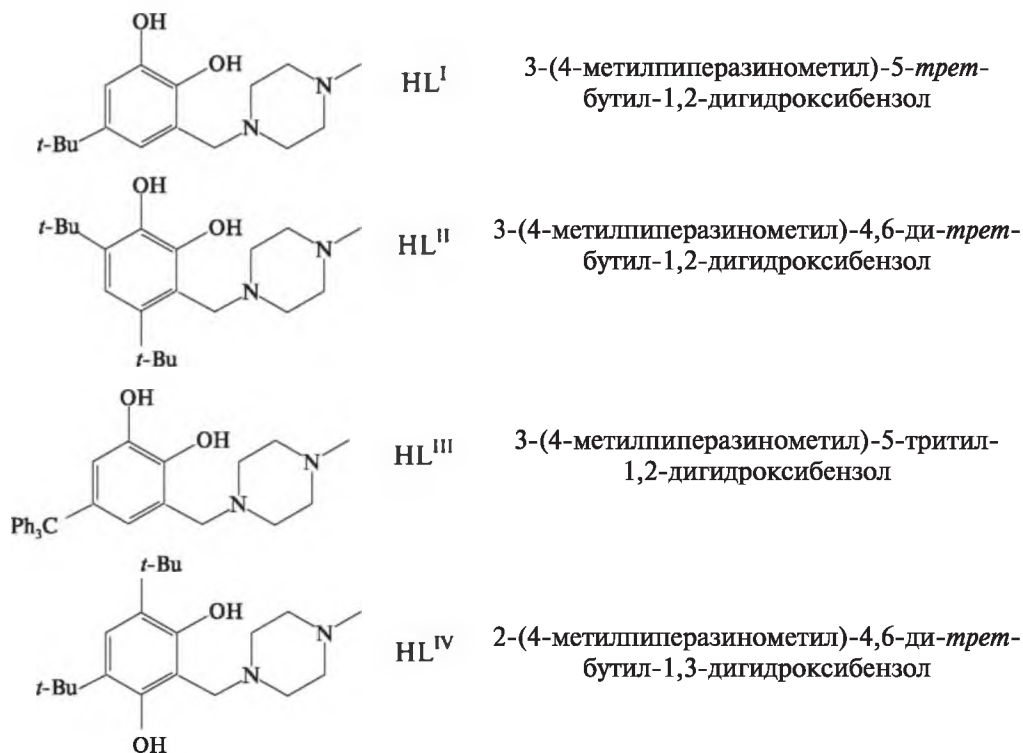


Рис. 1. Циклоаминометильные производные *орто*- и *мета*-дигидроксибензолов (HL^I – HL^{IV})

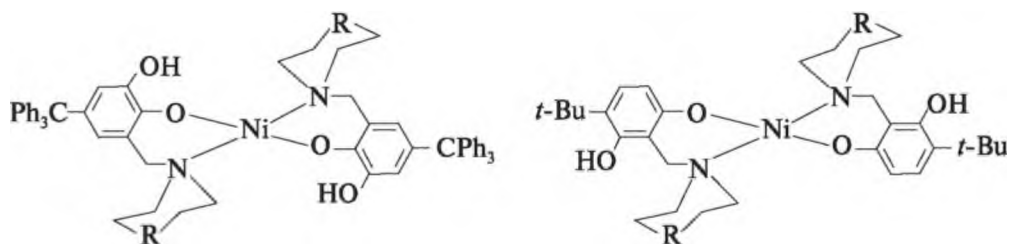


Рис. 2. Схематическое изображение структуры комплексных соединений Ni(II) с производными *орто*- и *мета*-дигидроксибензолов

Определение восстановительной активности лигандов и их комплексных соединений с Ni(II) в отношении Fe(III)–Сyt *c* из сердечной мышцы быка (Sigma Aldrich) проводили с использованием методики, разработанной нами с учетом специфики координационной природы исследуемых объектов. Аликвоту раствора исследуемого образца (лиганда или комплексного соединения) объемом $2 \cdot 10^{-2} \text{ см}^3$ ($1,75 \cdot 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$) добавляли к $1,8 \text{ см}^3$ Fe(III)–Сyt *c* ($6,2 \text{ мкмоль/дм}^3$) в Tris-буфере (2-амино-2-гидрокси-1-пропанол, 1,3-диол;

10 ммоль/дм³; рН 7,6). Концентрацию раствора Fe(III)—Cyt *c* определяли спектрофотометрически. Концентрации исследуемого вещества и фермента в реакционной смеси составляли 35 мкмоль/дм³ и 17,5 мкмоль/дм³ соответственно.

Оптическую плотность (A_{550}) реакционной смеси определяли на спектрофотометре Solar PB 2201; ее величину использовали для получения графической зависимости от времени (t , мин). Абсолютная погрешность определения скорости восстановления фермента не превышала $0,1 \cdot 10^{-9}$ моль/мин. Воспроизводимость результатов измерений (в пределах установленной погрешности), полученных в разных опытах или сериях образцов, оценивали по результатам трех независимых экспериментов.

Скорость реакции восстановления Fe(III)—Cyt *c* ($v_{\text{Cyt } c}$ моль/мин) определяли по уравнению

$$v_{\text{Cyt } c} = \frac{\text{tg}\alpha \cdot V}{\varepsilon_{550} \cdot l},$$

где $\text{tg}\alpha$ — тангенс угла наклона графика функции к оси абсцисс, мин⁻¹; V — объем реакционной смеси, дм³; ε_{550} — коэффициент молярной экстинкции цитохрома *c*, дм³/моль · см; l — длина оптического пути (ширина кюветы), см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная нами методика обеспечила получение экспериментальных данных для расчета величин скорости восстановления Fe(III)—Cyt *c* соединениями HL^I — HL^{IV} и их комплексными соединениями с Ni(II) (см. таблицу).

Скорость восстановления Fe(III)—Cyt *c* ($v_{\text{Cyt } c}$) и потенциал первого пика окисления соединений HL^I — HL^{IV} (E_{pa}^1) и их комплексных соединений Ni(L^I)₂ — Ni(L^{IV})₂

Соединение	$v_{\text{Cyt } c}$, моль/мин	E_{pa}^1 , В [9]
HL ^I	$9,9 \cdot 10^{-9}$	0,44
Ni(L ^I) ₂	$6,2 \cdot 10^{-10}$	0,53
HL ^{II}	$4,6 \cdot 10^{-9}$	0,93
Ni(L ^{II}) ₂	$1,5 \cdot 10^{-10}$	0,98
HL ^{III}	$5,4 \cdot 10^{-9}$	0,44
Ni(L ^{III}) ₂	$2,7 \cdot 10^{-9}$	0,58
HL ^{IV}	$1,4 \cdot 10^{-11}$	0,81
Ni(L ^{IV}) ₂	$7,6 \cdot 10^{-10}$	0,80

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее высокая восстановительная активность свойственна производным *орто*-дигидроксибензола. Величины их скорости восстановления Fe(III)—Cyt *c* варьируются в пределах $4,6 \cdot 10^{-9}$ — $9,9 \cdot 10^{-9}$ моль/мин и хорошо согласуются с извест-

ными литературными данными [14, 15] о том, что *орто*-дигидроксibenзол и его производные легко вступают в редокс-взаимодействие с Fe(III)–Cyt *c* по одно- или двухэлектронному механизму, благодаря возможности образовывать стабильные радикальные и хинонные формы (рис. 3). В отличие от них у *мета*-производных, не способных к образованию стабильных окисленных форм, восстановительная способность в отношении фермента крайне низкая или практически отсутствует, судя по полученным значениям $v_{\text{Cyt } c} = 1,4 \cdot 10^{-11}$ моль/мин.

Проведено сравнение скоростей восстановления фермента соединениями одготипных рядов в реакционной среде (определяющих их относительную антиоксидантную активность в биохимическом тестировании) и величин потенциалов первых пиков их окисления E_{pa}^1 (характеризующих в стандартных условиях устойчивость к окислению и восстановительные свойства [4, 9]). Выявлено, что этот термодинамический критерий E_{pa}^1 не является универсальным и не может использоваться для оценки восстановительной способности биоактивного соединения при его взаимодействии с ферментом *in vitro*.

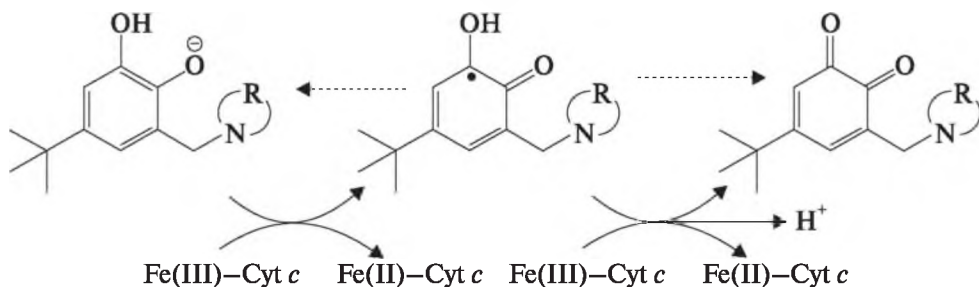


Рис. 3. Механизм редокс-взаимодействия Fe(III)–Cyt *c* и циклоаминометильного производного *орто*-дигидроксibenзола

Различие скоростей редокс-процесса в ряду лигандов HL^I, HL^{II} и HL^{III} позволяет предположить, что большее количество заместителей (две *трет*-бутильные группы в структуре HL^{II}) или их больший объем (трифенильная группа в структуре HL^{III}) создают пространственные затруднения и/или замедляют взаимодействие молекулы восстановителя с порфириновым центром фермента [14].

При использовании в качестве восстановителей комплексных соединений циклоаминометильных производных дигидроксibenзолов с ионами Ni(II) скорость восстановления Fe(III)–Cyt *c* заметно снижается ($v_{\text{Cyt } c} = 1,5 \cdot 10^{-10} - 7,6 \cdot 10^{-10}$ моль/мин). Этот факт может быть следствием комплексообразования дигидроксibenзолов с ионом Ni(II) и уменьшения концентрации анионных форм лиганда, необходимых для восстановления фермента. Ранее нами установлено, что комплексные соединения металлов могут взаимодействовать с Fe(III)–Cyt *c* как в молекулярной форме, так и посредством образующихся

при их диссоциации анионных форм лигандов и ионов металлов. Показано также, что изменение величин скоростей восстановления фермента комплексными соединениями по сравнению с исходными лигандами сложным образом зависит от способности вышеуказанных соединений к окислению и ионизации, а также от их степени липофильности [9]. Кроме того, образование комплексного соединения может приводить к смещению электронной плотности от лиганда к иону металла [16], что не согласуется с известным условием реализации эффективного переноса электронов от молекулы восстановителя к Fe(III)—Сут с, для которого, как показано в работе [14], необходима преимущественная локализация электронной плотности в бензольном фрагменте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки антиоксидантной способности производных дигидроксибензола и их комплексных соединений с Ni(II), проявляющих высокую антимикробную активность, разработана спектрофотометрическая методика определения скорости восстановления феррицитохрома Fe(III)—Сут с этими соединениями. Экспериментально подобраны условия, необходимые для реализации редокс-взаимодействия фермента и исследованных соединений: pH, буфер и концентрация компонентов реакционной смеси. Установлено, что производные *орто*-дигидроксибензола обладают наибольшей восстановительной активностью (скорость восстановления фермента $4,6 \cdot 10^{-9} - 9,9 \cdot 10^{-9}$ моль/мин), тогда как у *мета*-производных эта активность выражена крайне слабо (скорость составляет $1,4 \cdot 10^{-11}$ моль/мин). Показано, что образование комплексных соединений производных дигидроксибензола с Ni(II) приводит к снижению восстановительной способности этих лигандов в отношении фермента (скорость восстановления $1,5 \cdot 10^{-10} - 7,6 \cdot 10^{-10}$ моль/мин). Полученные результаты дают основание полагать, что взаимодействие с оксидоредуктазами (в частности с Fe(III)—Сут с) как макромолекулярными биомишенями может играть важную роль в реализации биоактивности исследованных редокс-активных соединений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. *Docampo R., Moreno S. N. J.* Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi* // *Rev. Infect. Dis.* 1984. Vol. 6, № 2. P. 223–238.
2. *Coyle B., Kinsella P., McCann M.* [et al.]. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes // *Toxicol. In Vitro.* 2004. Vol. 18, № 1. P. 63–70.
3. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine.* Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons. 2005.
4. *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications.* Berlin, Germany : Springer-Verlag, 2002.

5. *Dinis T. C. P., Madeira V. M. C., Almeida L. M.* Action of phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers // *Arch Biochem Biophys.* 1994. Vol. 315, № 1. P. 161–169.
6. *Cao G., Sofic E., Priora R. L.* Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships // *Free Radic Biol Med.* 1997. Vol. 22, № 5. P. 749–760.
7. *Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid // *Free Radic Biol Med.* 1996. Vol. 20, № 7. P. 933–956.
8. *Oyaizu M.* Studies on Products of Browning Reaction // *Musashino Nutrition College.* 1986. Vol. 44, № 6. P. 307–315.
9. *Loginova N. V.* Interaction of cytochrome c with redox-active dihydroxybenzene containing antimicrobials: application to antioxidant characterization // *Cytochrome c Roles and Therapeutic Implications.* NY : Nova Science Publisher, 2019.
10. *Thony-Meyer L.* Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997. Vol. 61. P. 337–376.
11. *Loginova N. V.* Pharmacologically active benzene derivatives: Synthesis, complexation with biometals, and biological evaluation of sterically hindered 1,2-dihydroxybenzene and *o*-aminophenol derivatives // *Benzene and Its Derivatives: New Uses and Impacts on Environment and Human Health.* NY : Nova Science Publisher, 2012.
12. *Горбацевич Г. И., Логинова Н. В., Набебина К. А.* [и др.]. Биоактивные комплексы Ni(II) с производными катехола // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Химия.* 2017. № 1. С. 58–64.
13. *Набебина К. А., Логинова Н. В., Ковальчук-Рабчинская Т. В.* [и др.]. Синтез и свойства редокс-активных комплексов Ni(II) с производными дигидроксибензола // *Свиридовские чтения : сб. ст. Минск, 2019. Вып. 15. С. 184–193.*
14. *Saleem M. M. M., Wilson M. T.* Kinetic studies on the reduction of cytochrome c // *Biochem. J.* 1982. Vol. 201. P. 433–444.
15. *Topen D. L.* Kinetics of reduction of horse-heart ferricytochrome c by catechol // *J. Am. Chem. Soc.* 1976. Vol. 98, № 13. P. 4023–4024.
16. *Loginova N. V., Kovalchuk T. V., Faletrov Y. V.* [et al.]. Redox-active metal(II) complexes of sterically hindered phenolic ligands: Antibacterial activity and reduction of cytochrome c. Part II. Metal(II) complexes of *o*-diphenol derivatives of thioglycolic acid // *Polyhedron.* 2011. Vol. 30, № 15. P. 2581–2591.

Поступила в редакцию 25.09.2020