

*На правах рукописи*



**Родионова Маргарита Викторовна**

**Выявление и исследование механизма действия новых  
синтетических ингибиторов карбоангидразы, фотосистемы II и  
глутатионредуктазы**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории управляемого фотобиосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

**Научный руководитель**

доктор биологических наук

**Аллахвердиев Сулейман Ифхан оглы**

**Официальные оппоненты:**

**Дымова Ольга Васильевна**

доктор биологических наук, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, и.о. ведущего научного сотрудника

**Шубин Владимир Вениаминович**

кандидат биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, старший научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет»

Защита диссертации состоится «22» декабря 2020 года в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499) 678-54-20; e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года.

**Ученый секретарь** диссертационного совета:

кандидат биологических наук



**Азаркович Марина Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Применение специфичных ингибиторов позволяет получить более обширную информацию о строении и работе ферментов. Исследование новых и уже существующих химических соединений на предмет ингибиторных свойств по отношению к различным реакциям растительного организма может быть первым шагом на пути к созданию средств защиты культурных растений. Некоторые виды сорных растений развили устойчивость к традиционно используемым гербицидам, а применение большого числа узкоспецифичных ингибиторов наносит ощутимый вред окружающей среде. В этом случае использование универсальных веществ, действующих сразу на несколько ключевых реакций растительного организма, стало бы более выгодным как с экологической, так и с экономической точки зрения. Кроме того, действие на ферменты карбоангидразу и глутатионредуктазу, характерные в том числе и для животной клетки, в перспективе может стать важной особенностью при разработке лекарственных препаратов в медицине человека и животных.

### **Степень разработанности темы исследования**

В последнее время ведутся активные исследования новых химических веществ, которые могут являться эффективными ингибиторами работы ферментов. Информация, полученная в ходе подобных исследований, является необходимой для синтеза соединений со свойствами, обуславливающими наиболее высокую эффективность, и действием по механизмам, отличным от описанных ранее. Таким образом, тема работы является актуальной, а степень разработанности проблемы, связанной с действием новых синтетических ингибиторов на карбоангидразную и фотосинтетическую активность фотосистемы 2 (ФС-2) и активность глутатионредуктазы, оставляет возможность проводить исследования в данной области.

### **Цели и задачи**

Цель настоящей работы – изучение механизма ингибиторного действия новых металлоорганических комплексов на основе двухвалентной меди на карбоангидразную и фотосинтетическую активность ФС-2, а также активность глутатионредуктазы.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- 1) оценить влияние новых комплексов меди(II) на фотохимическую активность ФС-2 и работу фотосинтетического аппарата;
- 2) оценить степень ингибирования карбоангидразной активности ФС-2, а так же активности глутатионредуктазы новыми комплексами меди(II);
- 3) выявить соединения, способные в наибольшей степени ингибировать вышеназванные активности, и сравнить полученные результаты с действием на модельные ферменты ( $\alpha$ -карбоангидраза из эритроцитов быка, глутатионредуктаза из *Saccharomyces cerevisiae*).

### **Научная новизна**

Было проведено подробное исследование новых металлорганических комплексов на основе ионов двухвалентной меди, впервые синтезированных и описанных на базе Университета Гази (Анкара, Турция), на предмет проявления ингибиторного действия по отношению к карбоангидразной и фотосинтетической активности ФС-2, а также активности  $\alpha$ -карбоангидразы эритроцитов быка и глутатионредуктазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, использованных в качестве классических модельных ферментов. Сделано предположение о возможном сайте действия и механизмах ингибирования вышеназванных активностей.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Применение новых ингибиторов позволяет получать более обширную информацию о строении и работе ферментов. Синтез химических соединений и изучение их свойств по отношению к процессам растительного организма необходимы для создания гербицидов и средств защиты культурных растений. Исследование действия таких соединений на ферменты, характерные и для животной клетки, вносит существенный вклад в разработку лекарственных препаратов в медицине человека и ветеринарии.

### **Методы и методология исследования**

В качестве методологической основы данной работы выступали общепринятые протоколы и методики. В работе применялись методы флуоресцентного анализа и флуоресцентной спектроскопии, оксиметрический и электрометрический методы, а

также спектрофотометрическая регистрация ферментативных кинетик. Для обработки результатов использовали широкий спектр компьютерных программ.

### **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Новые комплексы меди(II) способны подавлять фотохимическую активность ФС-2, причем сайт их действия предположительно находится на уровне компонентов реакционного центра ФС-2.
- 2) Новые комплексы меди(II) ингибируют карбоангидразную активность ФС-2 и глутатионредуктазную активность с разной эффективностью. Предполагается несколько различных механизмов действия ингибиторов, а также конкурентный или смешанный характер ингибирования.
- 3) Соединения, имеющие в своей структуре группу тиофена или тиазольное кольцо, являлись наиболее эффективными в отношении исследованных активностей.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Все эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах. Основные результаты научной работы были представлены на 4 российских и 4 международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 5 работ, из которых 4 – в международных рецензируемых изданиях. Статьи, опубликованные по материалам диссертации, прошли независимую рецензию, предшествующую публикации.

Диссертация построена по стандартной схеме (ГОСТ Р 7.0.11-2011) и состоит из титульного листа, оглавления, текста диссертации (введения, основной части, разделенной на главы: «обзор литературы», «объекты и методы исследования», «результаты и обсуждение»; и заключения), списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 175 наименований, из которых 165 – на английском языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В данном разделе освещаются общие вопросы применения ингибиторов для изучения различных процессов растительного организма. Рассматривается строение и функции ферментов карбоангидраз, особое внимание уделяется карбоангидразной активности ФС-2 растений, а также ингибиторам этой активности. Обсуждается строение и функции глутатионредуктазы как компонента глутатион-аскорбатного цикла, описаны основные виды активных форм кислорода (АФК) и работа антиоксидантной системы клетки. Уделяется внимание ингибиторам работы глутатионредуктазы. Кроме того, в работе рассматривается влияние меди как ингибитора клеточных реакций, а также обсуждаются возможные типы ингибирования ферментативных функций.

### Глава 2. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали препараты ФС-2, выделенные из листьев растений шпината огородного (*Spinacia oleracea*). В работе использовались такие коммерческие препараты, как высокоочищенная глутатионредуктаза из *Saccharomyces cerevisiae* (Е.С. 1.6.4.2) и  $\alpha$ -карбоангидраза из эритроцитов быка (Е.С. 4.2.1.1) (Sigma-Aldrich, США).

Новые металлорганические комплексы на основе двухвалентной меди с монодентатными (1-3) и бидентатными (4-9) лигандами, а также их отдельные лиганды (6L-9L) были синтезированы на базе Университета Гази, Анкара, Турция. Для анализа комплексы растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации маточного раствора 10 мМ.

**Выделение тилакоидных мембран** из двухнедельных листьев *S. oleracea* и получение нативных субхлоропластных мембранных частиц, обогащенных ФС-2 (ВВУ-частиц) из тилакоидов проводили по общепринятым методикам (Andersson, Anderson, 1985; Berthold et al., 1981).

**Фотосинтетическую активность** тилакоидов и ВВУ-частиц контролировали по фотоиндуцированным изменениям выхода флуоресценции хлорофилла ФС-2, связанным с фотовосстановлением первичного акцептора электрона ФС-2,

пластохинона  $Q_A$  ( $\Delta F$ ). Значения переменной флуоресценции ( $F_v$ ) рассчитывали по уравнению 1:

$$F_v = F_M - F_0 \quad (1)$$

где  $F_v$  – переменная флуоресценция;

$F_M$  – максимальная флуоресценция;

$F_0$  – начальная флуоресценция образца, адаптированного к темноте.

Значения максимальной квантовой эффективности ФС-2 ( $F_v/F_m$ ) рассчитывали по уравнению 2:

$$F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M \quad (2)$$

Фотоиндуцированные  $\Delta F$  регистрировали с помощью флуориметра Хе-РАМ (Heinz Walz, Германия), совмещенного с программным обеспечением PowerGraph (DISoft, Россия). Начальную флуоресценцию ( $F_0$ ) возбуждали слабым измерительным светом. Для изучения взаимодействия между фотосистемами использовали действующий свет 1, возбуждающий преимущественно ФС-1 (светофильтры КС19 + СЗС20), и свет 2, возбуждающий обе фотосистемы (стандартная настройка флуориметра).

**Измерение карбоангидразной активности** по скорости изменения рН при гидратации  $CO_2$  проводили электрометрическим методом, описанном в (Anderson, Wilbur, 1948). Карбоангидразная (КА) активность выражалась в единицах Вилбура и Андерсона (WAU) и рассчитывалась по уравнению 3:

$$WAU = (t_0 - t)/(t * m) \quad (3)$$

где  $t_0$  – время изменения рН при спонтанной реакции без добавок (контроль);

$t$  – время изменения рН в образце;

$m$  – количество хлорофилла (мг) в пробе.

**Измерение глутатионредуктазной активности** проводили по методу (Carlberg, Mannervik, 1985). Для измерения влияния комплексов меди(II) на восстановленную глутатионредуктазу (ГР) в кювету вносили буфер, НАДФН, фермент и комплекс, инкубировали 3 и 20 минут. Реакцию запускали добавлением окисленного глутатиона (GSSG). Для измерения влияния комплексов меди(II) на окисленную ГР, реакция запускалась добавлением НАДФН.

**Скорость фотосинтетического выделения кислорода** измеряли амперометрическим методом в стационарных условиях при непрерывном освещении согласно известной методике (Regner, Hanssum, 2009).

**Влияние комплексов меди(II) на ароматические аминокислоты (триптофан и тирозин) ФС-2** оценивали методом спектрофлуориметрии согласно известной методике (Jandourek et al., 2014).

**Действие комплексов меди(II) на тушение возбужденных состояний хлорофилла антенны** оценивали спектрофлуориметрически по методике, описанной в (Gones et al., 2017).

### Глава 3. Результаты и обсуждение

#### Действие комплексов меди(II) на фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2.

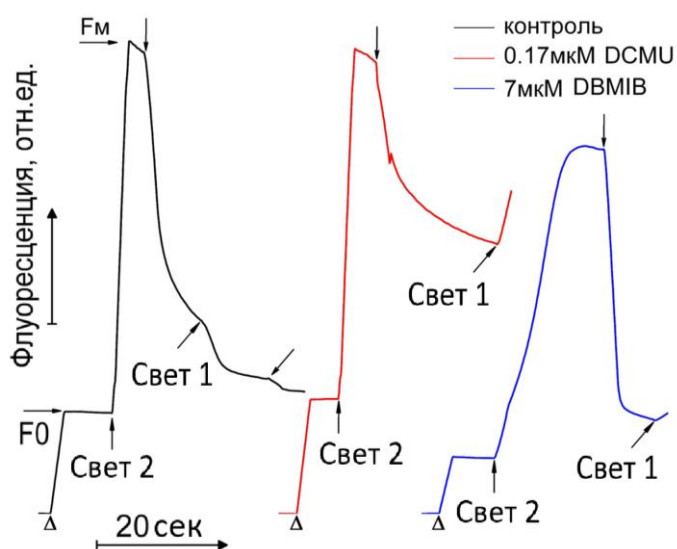


Рисунок 1. Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2 тилакоидов в присутствии DCMU и DBMIB.  $\Delta$  – включение слабого измерительного света ( $\lambda = 490$  нм,  $4 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ); Свет 1 возбуждает преимущественно ФС-1; Свет 2 возбуждает обе фотосистемы. Стрелки показывают включение ( $\uparrow$ ) и выключение ( $\downarrow$ ) действующего света.

Определение флуоресценции хлорофилла позволяет оценить состояние фотосинтетического аппарата растения. Характерные изменения параметров кинетики флуоресценции хлорофилла в тилакоидах, вызываемые известными ингибиторами переноса электрона DCMU и DBMIB, показаны на рис. 1. В контрольном образце включение света 1 вызывает ускорение темнового спада флуоресценции. Это свидетельствует о том, что при отсутствии ингибиторов возбуждение ФС-1 приводит к ускорению окисления  $Q_A$  и пула пластохинонов.



При добавлении DCMU, блокирующего окисление  $Q_A$ , даже слабый измерительный свет способен вызывать фотовосстановление  $Q_A$ , поэтому наблюдается увеличение уровня  $F_0$ . При этом темновой спад флуоресценции существенно замедляется, а включение действующего света 1 приводит к заметному увеличению уровня флуоресценции, так как перенос электронов между фотосистемами блокирован ингибитором, и незначительная часть света 2 в составе света 1 в этих условиях вызывает накопление фотовосстановленного  $Q_A$ .

В присутствии DBMIB наблюдается понижение уровня  $F_0$  вследствие тушения возбужденных состояний молекул антенного хлорофилла. При включении действующего света 2 скорость возрастания флуоресценции до уровня  $F_M$  существенно ниже, а темновой спад  $F_M$  происходит значительно быстрее, чем в контроле, так как DBMIB вызывает эффективное темновое окисление  $Q_A$ . Также, как и в случае DCMU, включение действующего света 1 приводит к накоплению фотовосстановленного  $Q_A$ . С учетом полученных данных мы провели сравнительные исследования комплексов меди(II) на  $\Delta F$  ФС-2 (рис. 2).

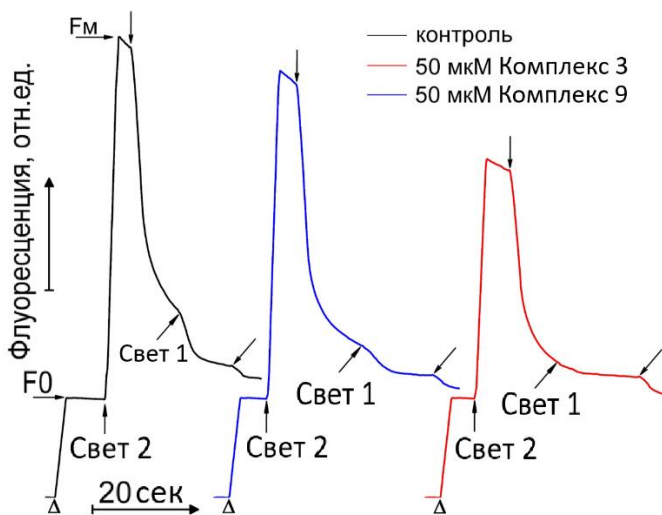


Рисунок 2. Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2 тилакоидов в присутствии комплексов меди(II).

$\Delta$  – включение слабого измерительного света ( $\lambda = 490\text{нм}$ ,  $4\text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{ с}^{-1}$ ); Свет 1 возбуждает преимущественно ФС-1; Свет 2 возбуждает обе фотосистемы. Стрелки показывают включение ( $\uparrow$ ) и выключение ( $\downarrow$ ) действующего света.

В присутствии комплексов происходит нарушение взаимодействия между фотосистемами, однако оно гораздо менее выражено, чем в случае с DCMU и DBMIB. Здесь основным эффектом является понижение уровня  $F_M$ , причем исключительно за счет уменьшения величины  $\Delta F$ . При этом никаких других воздействий, характерных для DCMU или DBMIB, у комплексов меди(II) не наблюдается. Очевидно, что уменьшение величины  $F_M$  в данном случае происходит по какой-то другой причине, так как нет

указаний на то, что эти эффекты вызываются тушением возбужденного состояния хлорофилла (уменьшение уровня  $F_0$ , замедление фотоиндуцированного возрастания флуоресценции) или акцептированием электрона от ФС-2 (ускорение темного спада  $F_M$ ). Таким образом, можно предположить, что основной эффект комплексов меди(II) связан с их действием на компоненты реакционного центра или донорной стороны ФС-2. Данные по процентному соотношению ингибирования фотосинтетической активности приведены на рис. 3.

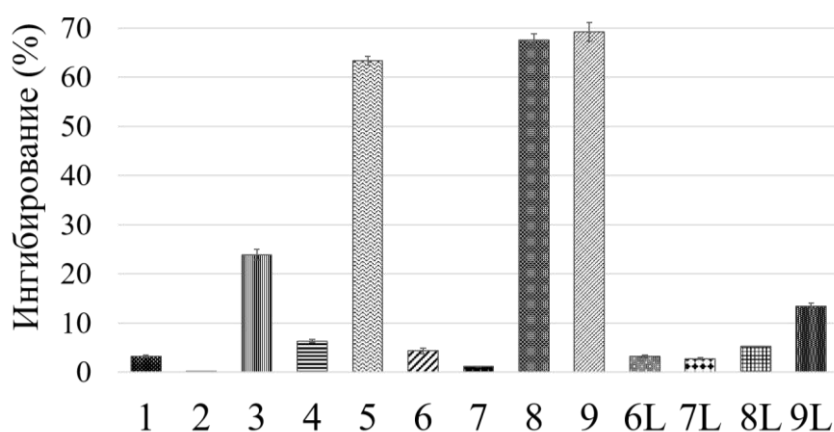


Рисунок 3. Ингибирование (%) фотосинтетической активности фотосистемы 2 тилакоидов комплексами меди(II) и их лигандами. В контрольном образце 0% ингибирования фотосинтетической активности.

Комплексы **5**, **8**, и **9** проявляют наибольшую активность в отношении ФС-2 (63.4, 67.6, 69.2%, соответственно). Комплексы **1**, **4**, **6**, **7** (3.2, 6.3, 4.3, 1.1%, соответственно) и лиганды **6L**, **7L** и **8L** (3.2, 2.7, 5.2%, соответственно) были наименее эффективны. Аналогичные результаты получены и на препаратах ФС-2.

**Влияние комплексов меди(II) на измерение скорости фотосинтетического выделения кислорода.** Пара двух акцепторов DCBQ и FeCy способна принимать электроны на уровне восстановленного вторичного акцептора ФС-2, пластохинона  $Q_B$ . DCBQ действует как акцептор электронов, а непроникающий FeCy сохраняет DCBQ в окисленном состоянии. На рис. 4 представлены данные по ингибированию выделения кислорода, обусловленное нарушением переноса электронов по всей электрон-транспортной цепи, а также на уровне ФС-2. Для предотвращения влияния закисления люмена на скорость фотосинтетического выделения кислорода в ячейку добавляли разбавитель  $NH_4Cl$ , который связывает протоны в люмене, рассеивая трансмембранный протонный градиент. Таким образом, транспорт электронов ускоряется.

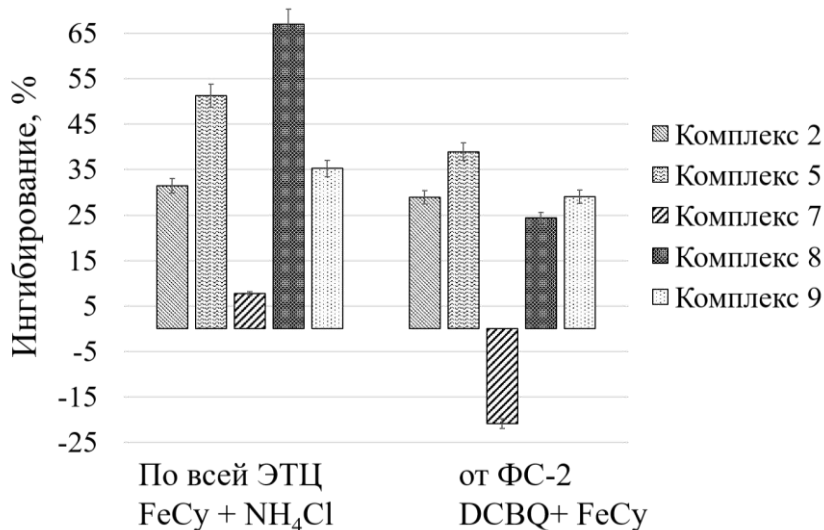


Рисунок 4. Ингибирование фотосинтетического выделения кислорода тилакоидами за счет ингибирования участков электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) комплексами меди(II).

Согласно результатам, при добавлении к реакционной смеси разбавителя все комплексы так или иначе подавляют перенос электрона и выделение кислорода. Однако для комплекса **7**, практически не влияющего на выделение кислорода при переносе электрона по всей ЭТЦ, было отмечено стимулирование выделения кислорода в отсутствии разбавителя в реакционной смеси (рис. 4). Возможно, подобный механизм действия схож с действием разбавителей, таких как NH<sub>4</sub>Cl.

### Влияние комплексов меди (II) на состояние полипептидов фотосинтетического аппарата.

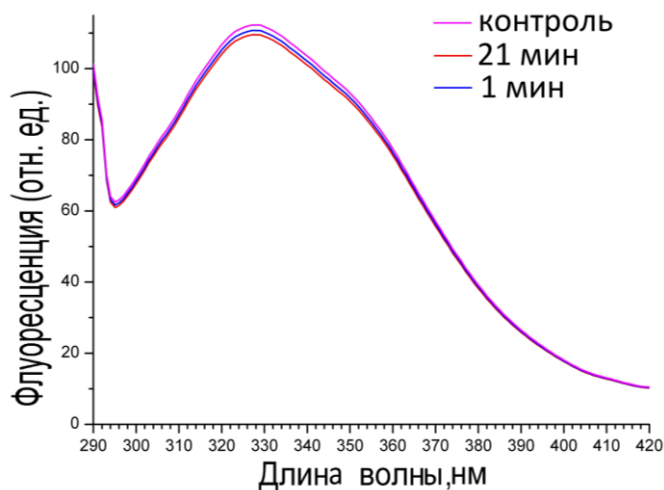


Рисунок 5. Спектры флуоресценции ароматических аминокислот полипептидов фотосинтетического аппарата в присутствии комплекса **3** (30мкМ) в зависимости от времени инкубации (1 и 21 мин).

Интактность фотосинтетических белков характеризует флуоресценция ароматических аминокислот (триптофан и тирозин) в составе полипептидов. Уменьшение интенсивности и сдвиг спектра флуоресценции ароматических аминокислот свидетельствует о нарушении структуры белка. На примере комплекса **3** (рис.5) было показано, что интенсивность тушения не увеличивается с течением времени, а причиной некоторого снижения флуоресценции является экрани-

рующее действие агента на интенсивность света, возбуждающего флуоресценцию. Аналогичные результаты получены и для остальных комплексов. Исходя из этих данных, можно утверждать, что исследованные комплексы меди(II) и их лиганды не оказывают на флуоресценцию ароматических аминокислот тилакоидов существенного влияния, и, следовательно, механизм их ингибиторного действия не связан с нарушением структуры полипептидов фотосинтетического аппарата.

**Влияние комплексов меди(II) на тушение возбужденных состояний хлорофилла антенны.** Известно, что некоторые химические агенты способны тушить возбужденные состояния хлорофилла антенны, понижая эффективность переноса возбуждения на реакционный центр.

На рис. 6 показано действие комплекса **3** в сравнении с DBMIB, известного тушителя возбужденных состояний хлорофилла (Belatik et al., 2013).

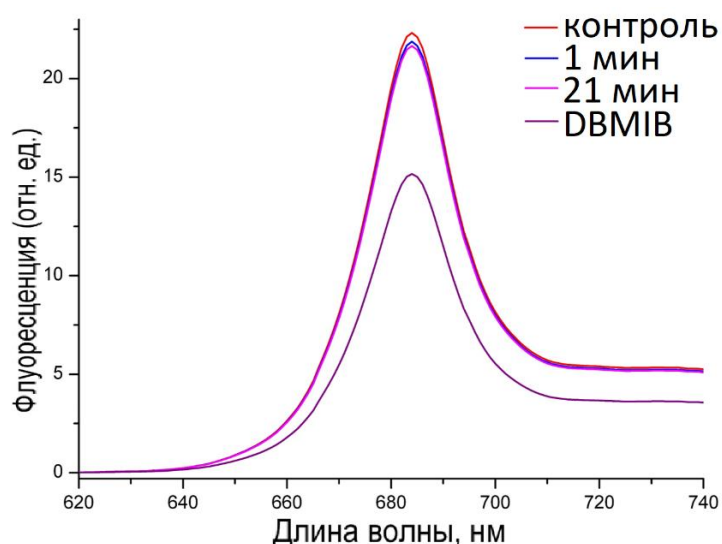


Рисунок 6. Спектры возбужденных состояний хлорофилла антенны в тилакоидах в присутствии комплекса **3** (30мкМ) и DBMIB (0.1 мкМ) в зависимости от времени инкубации (1 и 21 мин).

Аналогичное действие характерно для остальных комплексов. Как следует из полученных данных, комплексы меди(II), в отличие от DBMIB, не вызывают уменьшения интенсивности флуоресценции хлорофилла ни практически сразу после добавления, ни после 20 минут инкубации. Таким образом, они не являются тушителями возбужденных состояний хлорофилла.

**Действие комплексов меди(II) на карбоангидразную активность фотосистемы 2.** Из литературы известно, что подавление КА активности ФС-2 как известным ингибитором  $\alpha$ -карбоангидраз ацетазоламидом (Shitov et al., 2011), так и комплексами сурьмы(III) (Karacan et al., 2016) сопровождается снижением скоростей

переноса электрона на донорной стороне ФС-2. Комплексы меди(II) были исследованы на способность ингибировать КА активность ФС-2 (рис. 7).

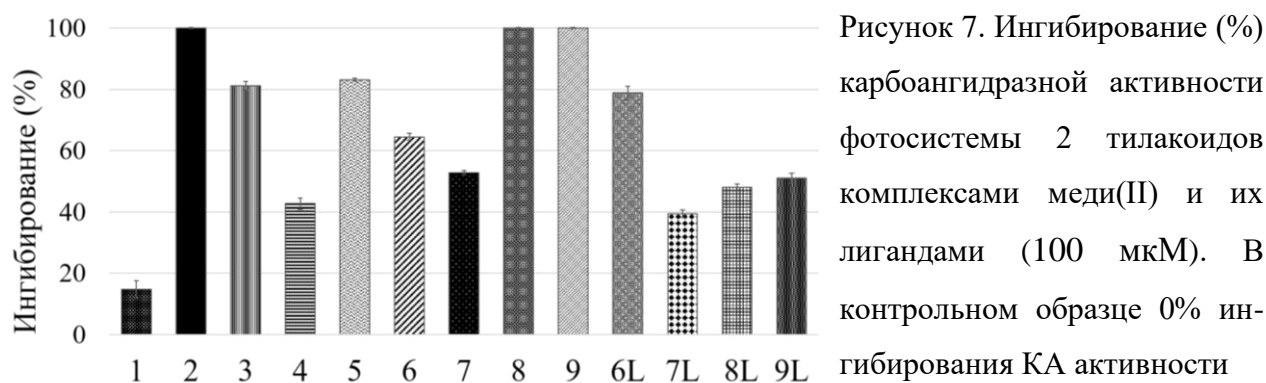


Рисунок 7. Ингибирование (%) карбоангидразной активности фотосистемы 2 тилакоидов комплексами меди(II) и их лигандами (100 мкМ). В контрольном образце 0% ингибирования КА активности

Комплексы **2**, **8** и **9** (100%) полностью ингибировали КА активность ФС-2. Комплексы **3**, **5** (81.1, 83.1%, соответственно), а также лиганд **6L** (78.9%) проявляли менее выраженное действие. В большинстве своем активность лигандов (**7L–9L**) была значительно ниже, чем соответствующих комплексов (39.4, 48, 51%, соответственно). Комплекс **1** обладает наиболее низкой активностью (14.7%). Тот факт, что комплексы меди(II) и их лиганды, включая те, что практически не подавляли фотохимическую активность ФС-2, способны ингибировать ее КА активность, подтверждает предположение о необходимости КА активности компонентов ФС-2 для ее максимальной фотохимической активности. При этом снижение КА активности сопровождается неполным подавлением переноса электронов.

**Действие комплексов меди(II) на активность  $\alpha$ -карбоангидразы эритроцитов быка.** В связи с тем, что  $\alpha$ -карбоангидраза ( $\alpha$ -КА) эритроцитов быка имеет структуру и характеристики активности, схожие с растительными  $\alpha$ -КА, мы исследовали комплексы меди(II) по отношению к этому ферменту. Это может дать больше информации о спорном источнике КА активности ФС-2. Согласно полученным данным (рис. 8), комплексы меди(II) подавляют активность  $\alpha$ -КА эритроцитов быка в меньшей степени, чем активность препаратов ФС-2.

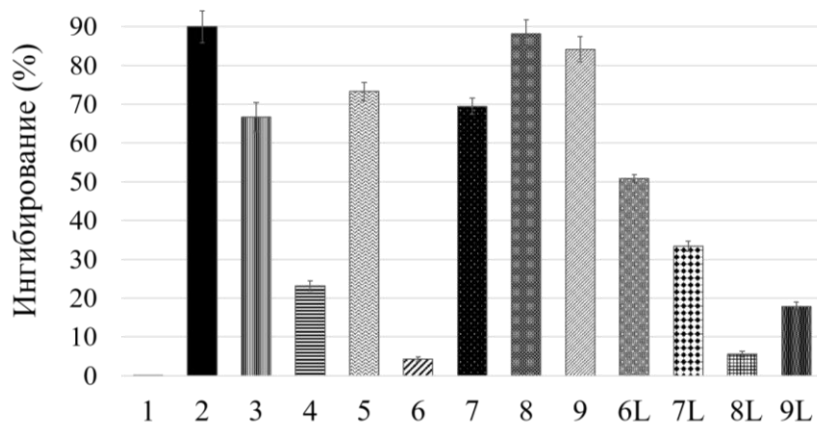


Рисунок 8. Ингибирование (%) активности  $\alpha$ -карбоангидразы эритроцитов быка комплексами меди(II) и их лигандами. В контрольном образце 0% ингибирования активности  $\alpha$ -КА.

Наиболее сильным действием обладают комплексы **2**, **8** и **9** (90, 88.2, 84.2%, соответственно). Комплекс **6** оказывал наиболее слабое действие (4.3%), а комплекс **1** не проявлял никакого эффекта, хотя он подавлял КА активность ФС-2 на 14%. Среди лигандов **6L** лучше всего ингибировал активность фермента (50.9%), а наиболее слабым действием обладал **8L** (5.6%). В целом, лиганды проявляли более слабое ингибиторное действие по сравнению с комплексами меди(II).

**Влияние комплексов меди(II) на активность глутатионредуктазы.** Глутатион и ГР являются важными компонентами антиоксидантной системы растений для защиты от окислительного стресса. Комплексы меди(II) и их лиганды были исследованы на предмет подавления активности ГР хлоропластов шпината. Данные по концентрациям полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) приведены в таблице 1. Значение  $IC_{50}$  отражает эффективность комплекса или лиганда при ингибиторном взаимодействии с ферментом. Эта величина является количественным индикатором, показывающим, сколько нужно агента для подавления реакции на 50%. Среди комплексов меди(II) с монодентатными лигандами наибольший эффект показал комплекс **3** (0.025 мкМ). Среди

Таблица 1. Значения концентрации полумаксимального ингибирования активности глутатионредуктазы хлоропластов шпината комплексами меди(II).

Комплекс	$IC_{50}$ (мкМ)
<b>1</b>	1.050
<b>2</b>	0.085
<b>3</b>	0.025
<b>4</b>	0.925
<b>5</b>	1.350
<b>6</b>	0.037
<b>7</b>	0.025
<b>8</b>	0.282
<b>9</b>	0.191
<b>6L</b>	0.324
<b>7L</b>	0.423
<b>8L</b>	0.528
<b>9L</b>	0.673

агентов с бидентатными лигандами комплексы **6** и **7**, имеющие триазинобензимидазол в качестве лигандов (производные **6L** и **7L**), проявляли самую лучшую активность (0.037 и 0.025 мкМ, соответственно). Комплексы **1** и **5** оказывали наименьшее действие. Тем не менее общая тенденция такова, что комплексы меди(II) наиболее эффективны против активности ГР, чем их отдельные лиганды.

**Ингибирование глутатионредуктазы *Saccharomyces cerevisiae*.** В литературе существуют данные о том, что по своему строению и функциям ГР из *S. cerevisiae* сходна с ферментом растений (Mapson, Isherwood, 1963).

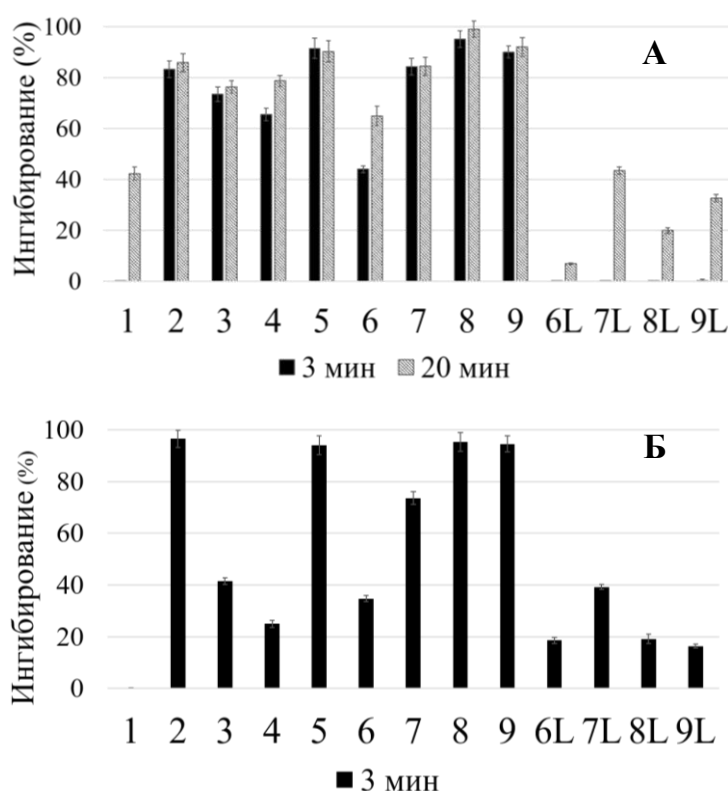


Рисунок 9. Зависимое от времени ингибирование (%) восстановленной (А) и окисленной (Б) форм глутатионредуктазы *S. cerevisiae* комплексами меди(II) (100 мкМ). В контрольном образце 0% ингибирования активности ГР.

восстановленный фермент хорошо подавляли активность окисленной ГР после 3 минут инкубации (рис. 9Б). Наиболее сильным действием в данном случае обладали комплексы **2**, **5**, **8** и **9** (96.51, 94.09, 95.41, 94.56%, соответственно); а комплексы **3**, **4** и **6** имели активность ниже 50%. Примечательно, что в данном случае эффективность

С целью изучения влияния комплексов меди(II) на фермент различных организмов, агенты были исследованы в отношении ГР из *S. cerevisiae*, являющихся известным модельным объектом в биологии (рис. 9). Согласно полученным результатам, уже после 3 минут инкубации наиболее эффективно действуют комплексы **8**, **5** и **9** (95.20, 91.57, 90.11%, соответственно), а лиганды (**6L-9L**) не подавляли активность восстановленной ГР (рис. 9А). Тем не менее, после 20 минут инкубации эффективность лигандов повышалась (рис. 9А). Однако и лиганды, и комплексы со слабым действием на

лигандов была значительно выше. Среди них наибольшей активностью обладал лиганд **7L** (39.23%).

При сравнении ингибиторной эффективности агентов по отношению к окисленной и восстановленной ГР можно отметить, что для некоторых комплексов меди(II) эффективность зависит от редокс-формы фермента. Однако тот факт, что восстановленная ГР в основном ингибируется только комплексами, в то время как окисленный фермент ингибируют и комплексы, и их лиганды, говорит о том, что эти ингибиторы могут действовать по двум различным механизмам. Можно предположить, что первым механизмом действия комплексы обязаны наличию иона меди в своем составе, который сначала окисляет некоторые компоненты фермента, а затем лиганд вызывает дополнительные необратимые изменения. Тот факт, что эффективность ингибирования восстановленной ГР слабо зависит от типа лиганда, свидетельствует в пользу такого предположения.

Для того, чтобы проверить, способны ли комплексы окислять восстановленную форму фермента (как это происходит при нормальном взаимодействии ГР со своим субстратом GSSG), были изучены спектры поглощения ГР на разных стадиях реакции с субстратом и кофактором, а также в присутствии наиболее мощного ингибитора обеих форм – комплекса **5** (рис. 10).

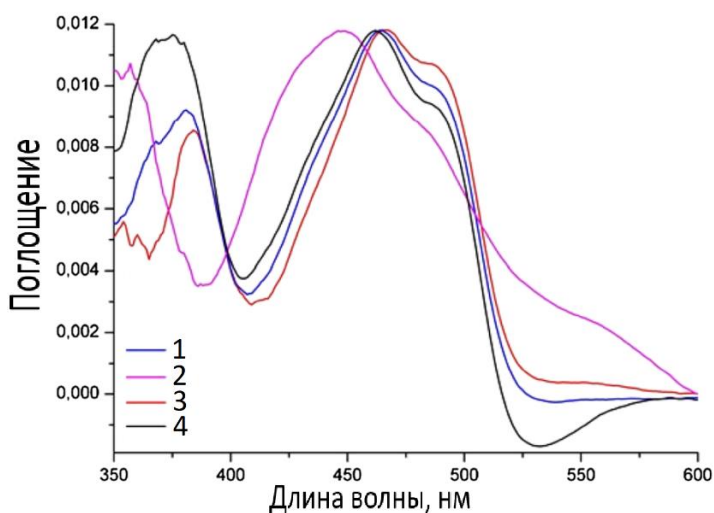


Рисунок 10. Спектры поглощения глутатионредуктазы *S. cerevisiae*.

1 – окисленный фермент;  
2 – фермент, восстановленный НАДФН; 3 – фермент, окисленный в присутствии GSSG; 4 – фермент, окисленный при добавлении комплекса **5** (100 мкМ).

Окисленный фермент имеет пик поглощения в районе 462 нм. При добавлении НАДФН происходит восстановление ГР, и пик смещается в коротковолновую сторону. При окислении фермента в ходе реакции с субстратом GSSG пик снова возвращается на начальное значение (рис. 10). Исходя из полученных спектров, комплекс **5** способен



окислять ГР по типу субстрата GSSG. Это говорит в пользу второго механизма действия комплексов – они способны подавлять дальнейшую реакцию ГР с GSSG, отбирая восстанавливающие эквиваленты от фермента.

### Определение типа ингибирования активности глутатионредуктазы.

Для того, чтобы оценить тип ингибирования комплексов меди(II) по отношению к субстрату (GSSG) и кофактору (НАДФН), измерения активности глутатионредуктазы проводили в присутствии разных концентраций ингибитора, субстрата и кофактора. Данные представляли в виде графиков зависимости скорости восстановления глутатиона ферментом от концентрации субстрата или кофактора в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка (зависимость  $1/V_m$  от  $1/[GSSG]$  или от  $1/[НАДФН]$ ). Константа Михаэлиса определяется как концентрация ингибитора, вызывающая подавление скорости реакции на 50%, и определяется в точке пересечения продолженной прямой с отрицательной половиной оси X. При этом максимальная скорость ферментативной реакции не меняется. Об этом свидетельствует совпадение положения точек пресечения обеих прямых с осью Y. Эта точка дает информацию о величине максимальной скорости реакции (рис.11).

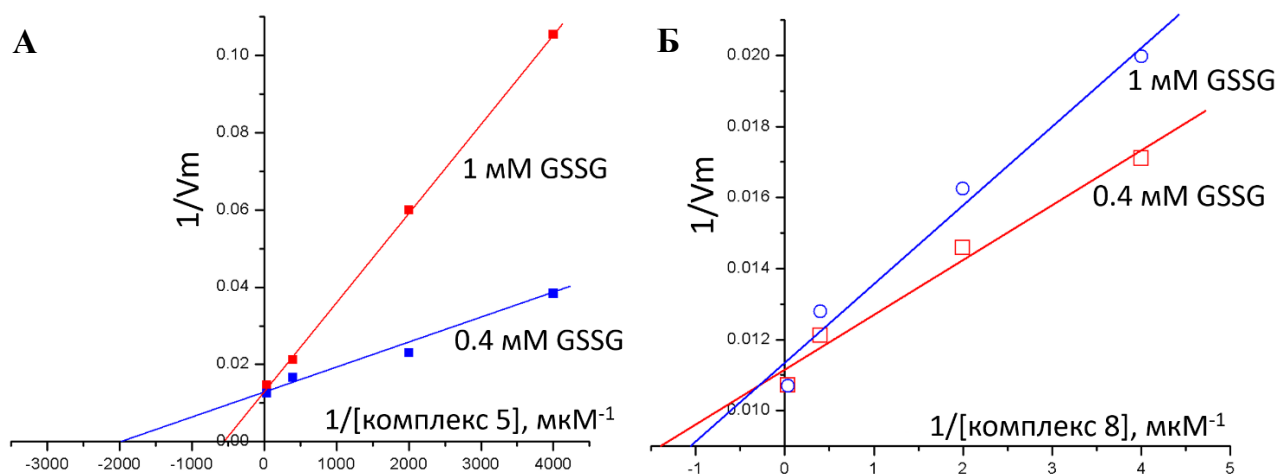


Рисунок 11. Концентрационная зависимость ингибиторной эффективности комплексов меди(II) по отношению к GSSG. А – в присутствии комплекса 5; Б – в присутствии комплекса 8.

Из графика, показывающего ингибирование по отношению к субстрату (рис. 11-А), следует, что комплекс 5 действует на активность глутатионредуктазы как ингибитор, конкурирующий с GSSG. В то же время, в случае с комплексом 8 константа Михаэлиса незначительно уменьшается, однако прямые, описывающие ингибирование

при разных концентрациях субстрата, пересекаются за осью Y, что указывает на изменение максимальной скорости реакции. Это может говорить о том, что комплекс **8** действует как ингибитор смешанного типа (рис. 11-Б).

Несмотря на различия в ингибировании по отношению к GSSG, в отношении кофактора ингибиторы проявляют схожие схемы смешанного ингибирования (рис. 12).

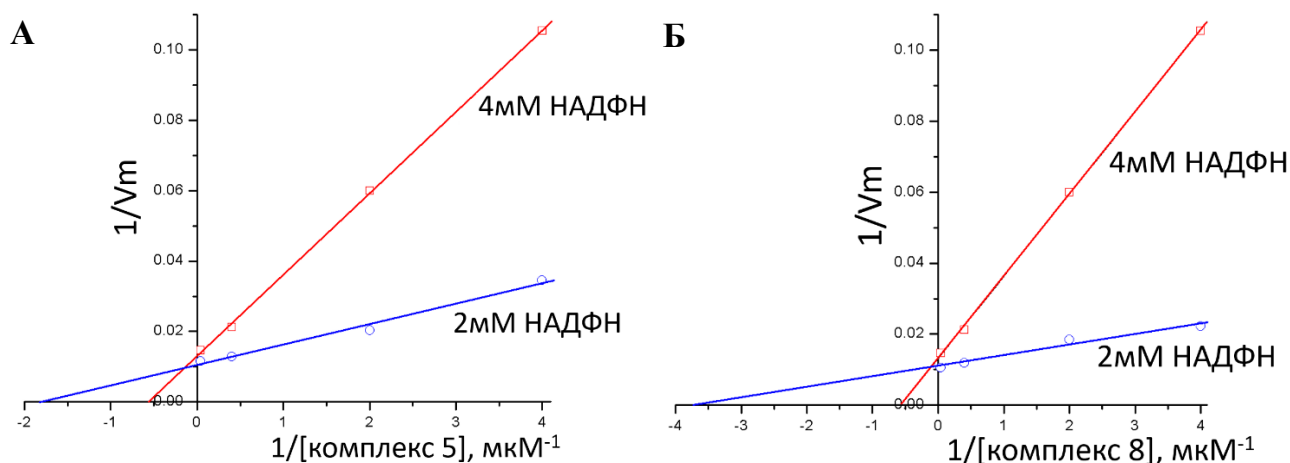


Рисунок 12. Концентрационная зависимость ингибирующей эффективности комплексов меди(II) по отношению к НАДФН. **А** – в присутствии комплекса **5**; **Б** – в присутствии комплекса **8**.

В данном случае как для комплекса **5**, так и для комплекса **8** характерно значительное увеличение константы Михаэлиса при увеличении концентрации НАДФН. При этом скорость реакции изменяется слабо. Это может свидетельствовать о смешанном типе ингибирования, однако он не является ярко выраженным в силу условий реакции, например, при изменении рН среды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования металлоорганических комплексов на основе двухвалентной меди было выявлено, что все комплексы в той или иной мере способны подавлять фотосинтетическую и карбоангидразную активность ФС-2, а также активность глутатионредуктазы. Однако степень ингибиторного действия сильно зависит от структуры комплекса.

Сравнение ингибиторной эффективности комплексов меди(II) **1-3**, имеющих монодентатные лиганды, показало, что увеличение количества атомов, замещающих атомы углерода в ароматическом бензол-подобном гетероциклическом кольце

лиганда, незначительно влияет на фотохимию ФС-2. При этом, положение боковой аминогруппы ( $R-NH_2$ ) в гетероциклическом кольце относительно атома азота, связывающего ион меди, также может играть важную роль. У комплексов **1** и **2** боковая аминогруппа расположена в непосредственной близости к атому азота, связывающему ион меди, в то время как в случае с комплексом **3** позиция этой группы строго противоположна.

В случае бидентатного 2-гуанидобензимидазольного лиганда комплекса **4** и лиганда комплекса **5**, представленного 2-гуанидобензотиазолом, единственное отличие заключается в том, что в пятичленном тиазольном кольце атом серы более электроотрицательный, чем атом азота в имидазольном кольце. Эта особенность сильно влияет на ингибиторное действие агентов по отношению к ФС-2. Такая же тенденция наблюдается и в случае с другими парами комплексов, имеющих бидентатные лиганды, отличающиеся только наличием атома серы (бензотиазол комплексов **8** и **9**) вместо атома азота (бензимидазол комплексов **6** и **7**).

Что касается эффективности лигандов (**6L–9L**), было выявлено, что все лиганды проявляют довольно низкую ингибиторную активность по сравнению с их комплексами меди(II). Это свидетельствует о том, что медь является необходимым условием для проявления ингибиторной активности в составе комплексных соединений.

В случае с ингибированием глутатионредуктазы, структура комплексов меди(II) также играет важную роль в определении их активности. Так, среди комплексов с монодентатными лигандами (**1-3**) ингибиторная активность возрастает с увеличением количества атомов азота в ароматическом кольце. В случае с комплексами, обладающими бидентатными лигандами, те, что имеют бензотиазольную группу (**5, 8, 9**) эффективнее подавляют активность глутатионредуктазы, чем имеющие бензимидазольное кольцо агенты (**4, 6, 7**). Наиболее мощные ингибиторы активности обеих форм глутатионредуктазы в своей структуре имеют бидентатные лиганды с атомами азота, координирующими центральный атом меди. Комплекс **5**, несущий кольцо бензотиазола, обладает наибольшей ингибиторной активностью. Кроме того, было обнаружено, что ингибиторное действие комплексов иногда снижается со

временем. Это может происходить от потери комплексом стабильности удерживания электронов от НАДФН.

## ВЫВОДЫ

1. Новые комплексы меди(II) способны подавлять фотохимическую активность ФС-2, причем сайт их действия предположительно находится на уровне компонентов реакционного центра ФС-2.
2. Новые комплексы меди(II) ингибируют карбоангидразную активность ФС-2 более эффективно, чем активность  $\alpha$ -карбоангидразы эритроцитов быка. При этом снижение карбоангидразной активности сопровождается частичным подавлением переноса электронов.
3. Новые комплексы меди(II) подавляют активность глутатионредуктазы с разной эффективностью. Предполагается, что комплексы меди(II) способны нарушать структуру GSSG-связывающего сайта глутатионредуктазы, не нарушая НАДФН-связывающий сайт, а также конкурировать за субстрат реакции (GSSG).
4. Соединения, имеющие в своей структуре группу тиофена или тиазольное кольцо, являлись наиболее эффективными в отношении исследованных активностей.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных международных рецензируемых журналах

Karacan M.S., Rodionova M.V., Tunç T., Venedik K.B., Mamaş S., Shitov A.V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V., Karacan N., Allakhverdiev S.I. (2016) Characterization of nineteen antimony(III) complexes as potent inhibitors of photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase. *Photosynth. Res.*, 130 (1), 167-182.

Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Karacan M.S., Venedik K.B., Shitov A.V., Tunç T., Mamaş S., Kreslavski V.D., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. (2017) Evaluation of new Cu(II) complexes as a novel class of inhibitors against plant carbonic anhydrase, glutathione reductase, and photosynthetic activity in photosystem II. *Photosynth. Res.*, 133 (1-3), 139-153.

Shitov A.V., Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K., Rodionova M.V., Karacan M., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. (2018) Is carbonic anhydrase activity of

photosystem II required for its maximum electron transport rate? *BBA – Bioenergetics*. 1859, 292-299.

Rodionova M.V., Khalilova L.F., Karacan M.S., Karacan N., Zharmukhamedov S.K., Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I. (2018) Novel antimony(III) complexes possess inhibitory effect on photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase of higher plants. *Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS*, 2, 16-20.

Khalilova L., Rodionova M.V., Karacan M.S., Karacan N., Alwasel S., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Allakhverdiev S.I. (2020) The inhibitory effect of new antimony (III)-based organometallic complexes on the photochemical activity of photosystem II and the activity of chloroplast carbonic anhydrase and glutathione reductase. *Nanotechnologies in Russia*, 15(1), 90-95. (в печати)

#### **Публикации в сборниках конференций**

Rodionova M.V., Karacan M.S., Tunc T., Venedik K.B., Mamas S., Shitov A.V., Karacan N., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. (2016) New antimony(III) complexes as potent inhibitors of photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase, International conference “Photosynthesis research for sustainability in honor of Nathan Nelson and Turhan Nejat Veziroglu”, Пущино, Россия, с. 155.

Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Allakhverdiev S.I. Novel Cu(II)-organic inhibitors of carbonic anhydrase, glutathione reductase and photosynthetic activity of plant photosystem II. International Conference “Photosynthesis and hydrogen energy research for sustainability in honor of A.P. Raghavendra, W.A. Cramer, and Govindjee”, Хайдарабад, Индия, 2017, p.178.

Rodionova M., Zharmukhamedov S.K., Karacan M.S., Karacan N., Shen J.-R., Allakhverdiev S.I. (2018) New Cu(II) complexes effectively inhibit plant carbonic anhydrase, glutathione reductase, and photosynthetic activity of photosystem II. The 1-st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis, Пекин, Китай, p.162-163.

Rodionova M., Khalilova L., Zharmukhamedov S., Allakhverdiev S. (2019) Synthetic Cu(II) complexes affect reaction center components of photosystem II. International

Conference “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti and Anthony Larkum”, Санкт-Петербург, Россия, p. 76.

Родионова М.В., Карацан М.С., Тунц Т., Венедик К.Б., Мамас С., Шитов А.В., Карацан Н., Жармухамедов С.К., Климов В.В., Аллахвердиев С.И. (2016) Новые синтетические комплексы в качестве ингибиторов фотосинтетической активности фотосистемы 2, карбоангидразы и глутатионредуктазы, V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM. *Acta Naturae*, Спецвыпуск, т.1, с. 220.

Родионова М.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2017) Выявление новых ингибиторов глутатионредуктазной, карбоангидразной, а также фотосинтетической активности фотосистемы 2 растений. Съезд Российского фотобиологического сообщества, Всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии», Шепси, Россия, с.107.

Родионова М.В., Жармухамедов С.К., Халилова Л.Ф., Фейзиев Я.М., Гусейнова И.М., Аллахвердиев С.И. (2019) Механизм ингибирования глутатионредуктазы дрожжей новыми металлорганическими комплексами на основе ионов меди. VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды». *Acta Naturae*, Спецвыпуск, т. 2, с. 136.