

УДК С07D 417/ 12+577.151.1

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ  
СОЕДИНЕНИЙ КЛАССА 1,3,4-ТИАДИАЗИНА В УСЛОВИЯХ  
IN VITRO**

© 2014 Н.Ж. Алисултанова<sup>1</sup>, Н.А. Вахнина<sup>1</sup>, В.Д. Шадрина<sup>1</sup>, Л.П. Сидорова<sup>2</sup>,  
Е.Р. Бойко<sup>1</sup>, О.Н. Чупахин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, г. Сыктывкар

<sup>2</sup> Уральский Федеральный университет, г. Екатеринбург

<sup>3</sup> Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург

Поступила в редакцию 08.12.2014

Статья посвящена изучению влияния производных класса 1,3,4-тиадиазина, таких как L-2, L-4, L-6, синтезированных в Уральском Федеральном университете под руководством академика О.Н. Чупахина, на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс в условиях *in vitro*. Показано, что в отличие от вещества L-6, которое не оказывает значительного воздействия на активность фермента, соединения L-2 и L-4 в разной степени ингибируют сукцинатдегидрогеназу, снижая ее активность в 2 и 4 раза, соответственно, по сравнению с нативными митохондриями ( $p < 0,001$ ). Мы полагаем, что выявленное отличие связано с наличием различных функциональных групп в химической структуре производных класса 1,3,4-тиадиазина.

Ключевые слова: *митохондрия, сукцинатдегидрогеназа, тиадиазины*

Митохондрии играют центральную роль в клеточном метаболизме, обеспечивая процесс клеточного дыхания, связанного с генерацией АТФ, необходимого для функционирования клетки и организма в целом [14]. Основу митохондриального энергетического метаболизма составляют реакции цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий, одним из показателей работы которых является активность сукцинатдегидрогеназы [8]. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ; КФ 1.3.99.1) – это гетеротетрамерный,

ФАД-зависимый ферментный комплекс, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий. СДГ относится к классу оксидоредуктаз и катализирует реакцию окисления сукцината до фумарата в составе цикла Кребса. В результате этой реакции образуется восстановленный ФАД, электроны от которого через железо-серные центры СДГ переносятся на убихинон электрон-транспортной цепи митохондрий [11]. Таким образом, СДГ участвует как в реакциях цикла Кребса, так и в транспорте электронов в составе сукцинат: убихинон-оксидоредуктазы (комплекса II) митохондриальной дыхательной цепи, поэтому, изменяя ее активность воздействием различных химических агентов, можно регулировать процессы клеточного дыхания и энергетического метаболизма [8].

1,3,4-тиадиазиновый цикл является шестичленным гетероциклическим соединением, содержащим два атома азота и один атом серы [5]. Известны производные класса 1,3,4-тиадиазина, обладающие широким спектром биологической активности, что позволяет их рассматривать в качестве основы для создания фармакологических препаратов. Так, в результате исследований ряда новых производных 1,3,4-тиадиазина,

*Алисултанова Надежда Жафаровна, младший научный сотрудник. E-mail: alisultanova.nadezhda@mail.ru*

*Вахнина Надежда Алексеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: vakhnina80@mail.ru*

*Шадрина Вера Дмитриевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: Vera.shadrina56@mail.ru*

*Бойко Евгений Рафаилович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий Отделом экологической и медицинской физиологии. E-mail: erbojko@physiol.komisc.ru*

*Сидорова Лариса Петровна, кандидат химических наук, доцент. E-mail: vlapp@isnet.ru*

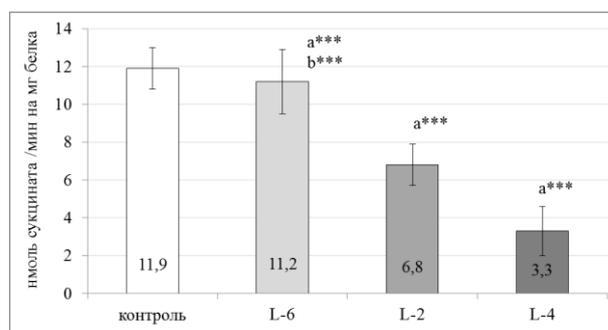
*Чупахин Олег Николаевич, академик РАН, научный руководитель института. E-mail: chupakhin@ios.uran.ru*

выявлены вещества, обладающие миорелаксирующей, антиспазмолитической активностью [10], вещества с гипоподемическим и гипергликемическим эффектами [6], показана способность некоторых тиадиазинов снижать агрегацию тромбоцитов [9] и действовать на течение системного воспаления при остром инфаркте миокарда [13] и остром панкреатите [12]. Несмотря на широкий спектр фармакологического действия производных класса 1,3,4-тиадиазина, механизм их действия на клеточном уровне остается мало изученным.

**Цель исследования:** оценка активности СДГ митохондрий печени крыс под воздействием новых производных класса 1,3,4-тиадиазина в условиях *in vitro*.

**Методика исследования.** Объектами исследования являлись самцы и самки половозрелых крыс линии Wistar ( $n=7$ ,  $m=300\pm 50$  г), которых содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением основных зоологических требований [3]. Экспериментальных животных наркотизировали и извлекали печень, которую максимально быстро промывали ледяной средой выделения, содержащей 0,25 М сахарозу и 0,001 М ЭДТА- $\text{Na}_2$ , после чего ее измельчали и гомогенизировали на гомогенизаторе Potter S (Sartorius, Germany). Митохондриальную фракцию из гомогената печени выделяли в градиенте сахарозы методом дифференциального центрифугирования (2220-10750 об./мин.) с использованием центрифуги Avanti J-30I (Beckman Coulter Inc., USA) при температуре 0-2°C [2]. Все процедуры по выделению митохондриальной фракции из печени крыс проводили на льду при температуре 0-4°C. Концентрацию белка в полученной суспензии митохондрий определяли биуретовым методом [4]. После выделения суспензию митохондрий подвергали процессу трехкратного замораживания/оттаивания для разрушения мембраны и высвобождения фермента. Новые производные 1,3,4-тиадиазина (L-2, L-4, ТД-6), синтезированные в Уральском Федеральном университете под руководством академика О.Н. Чупахина, растворяли в ДМСО (10 мг/мл). Митохондрии инкубировали с растворами тиадиазиновых соединений в соотношении 1:1 в течение 10-ти минут при комнатной температуре. Активность СДГ митохондрий печени экспериментальных животных до и после инкубации с производными 1,3,4-тиадиазина определяли феррецианидным методом [7]. Данные по активности СДГ митохондрий печени крыс представлены в статье как  $M\pm SD$ . Значимость различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса с последующим использованием метода Данна; различия считали значимыми при  $p<0,05$  [1].

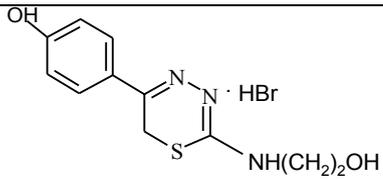
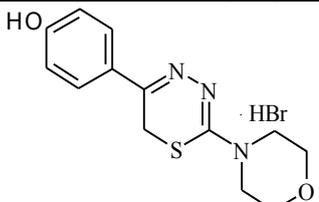
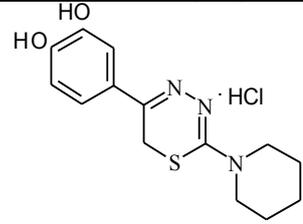
**Результаты исследования.** Статистический анализ показателей активности СДГ в суспензии митохондрий печени крыс до и после инкубации с растворами производных 1,3,4-тиадиазина не выявил значимых различий между самками и самцами ( $p>0,05$ ), что позволило объединить их в одну выборку. Активность фермента в суспензии нативных митохондрий составила  $11,9\pm 1,1$  нм сукцината/мин на мг белка (рис. 1.), что соответствует нормальному значению активности СДГ митохондрий печени крыс [4]. На рис. 1. показано, что производные 1,3,4-тиадиазина, такие как L-2 и L-4, в разной степени оказали ингибирующее влияние на активность СДГ печени крыс, снизив ее в 2 и 4 раза соответственно, относительно активности СДГ в нативных митохондриях ( $p<0,001$ ) (рис. 1). Однако после инкубации суспензии митохондрий печени экспериментальных животных с соединением L-6 значимых изменений в активности фермента, по сравнению с контрольным значением, не выявлено ( $p>0,05$ ).



**Рис. 1.** Активность СДГ в суспензии митохондрий печени крыс до и после инкубации с растворами производных 1,3,4-тиадиазина (различия значимы при  $p<0,001$ : а – по сравнению с контролем; b – по сравнению с L-4)

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, позволяют предположить, что различная ингибирующая активность производных 1,3,4-тиадиазина по отношению к СДГ митохондрий печени крыс связана с химической структурой данных соединений (табл. 1). Из табл. 1. видно, что химические структуры соединений L-2 и L-4 отличаются друг от друга характером заместителя во 2-м положении тиадиазинового кольца. Мы предполагаем, что максимальный эффект L-4 на активность СДГ митохондрий печени крыс обусловлен наличием остатка морфолина во втором положении тиадиазинового кольца. В структуре вещества L-6 в 1,3,4-тиадиазининовом кольце в качестве заместителя в положении-2 вместо морфолина находится пиперидин (табл. 1), и это соединение уже не является активным по отношению к СДГ и не приводит к ингибированию фермента.

**Таблица 1.** Химическая структура производных 1,3,4-тиадиазина

Соединение	Химическая формула и название
L-2	 <p>2-Гидроксиэтиламино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид</p>
L-4	 <p>2-морфолино-5-(4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид</p>
L-6	 <p>2-пиперидино-5-(3'4'-гидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидрохлорид</p>

**Выводы:** в ходе скрининга тестируемых веществ выявлены как соединения, не оказывающие влияния на активность СДГ митохондрий печени крыс, так и соединения, в разной степени ингибирующие активность фермента.

Работа выполнена совместно с Уральским Федеральным университетом и с Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН России при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект 12-П-4-1031).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. 459 с.
2. Егорова, М.В. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 26. № 1. С. 22-28.
3. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. Изд.3-е, перераб. и доп. – Киев.: Вища школа, 1983. 380 с.
4. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.
5. Леонтьева, Е.А. Поиск блокаторов реакции неферментативного гликозилирования белков среди производных 1,3,4-тиадиазина / Е.А. Леонтьева, А.В. Мусальникова // Достижения в химии и химической технологии. 2013. С. 37-40.
6. Применение 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида в качестве средства, обладающего гиполипидемическим и гипергликемическим эффектом: патент Рос. Федерации № 2411936; заявл. от 20.02.2011.
7. Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / учеб. пособие под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
8. Brooks, P.S. A shortcut to mitochondrial signaling and pathology: A commentary on “Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress” / P.S. Brooks, R.S. Freeman, M.C. Barone // Free Radical Biology and Medicine. 2006. V. 41. P. 41-45.
9. Campillo, N. Novel bronchodilators: synthesis, transamination reactions, and pharmacology of a series of pyrazino[2,3-c][1,2,6]thiadiazine 2, 2-dioxides / N. Campillo, C. Garcia, P. Goya et al. // J. Med. Chem. 2000. V. 43 (22). P. 4219-4227.
10. Novikova, A.P. Synthesis and properties of functional derivatives of 1,3,4-thiadiazines and condensed sys-

- tems based on these compounds / A.P. Novikova, N.M. Perova, O.N. Chupakhin // Chem. Heterocyclic Comp. 1992. V. 11. P. 1443–1457.
11. Rutter, J. Succinate dehydrogenase – assembly, regulation and role in human disease / J. Rutter, D.R. Winge, J.D. Schiffman // Mitochondrion. 2010. V. 10. P. 393–401.
  12. Sarapultsev, A. The correctional modification of inflammatory response at the experimental acute pancreatitis / A. Sarapultsev, O. Chupakhin, M. Rantsev et al. // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2012. V. 3. P. 442–448.
  13. Sarapultsev, P. New insights in to the treatment of myocardial infarction / P. Sarapultsev, O. Chupakhin, A. Sarapultsev et al. // Int. J. Exp. Pathol. 2012. V. 93 (1). P. 18–23.
  14. Singh, S. Ascorbic acid improves mitochondrial function in liver of arsenic-treated rat / S. Singh, S.V.S. Rana // Toxicology and Industrial Health. 2010. V. 26(5). P. 265–272.

## ALTERATION OF SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT LIVER MITOCHONDRIA BY 1,3,4-THIADIAZINE CLASS COMPOUNDS *IN VITRO*

© 2014 N.J. Alisultanova<sup>1</sup>, N.A. Vakhnina<sup>1</sup>, V.D. Shadrina<sup>1</sup>, E.R. Boyko<sup>1</sup>, L.P. Sidorova<sup>2</sup>, O.N. Chupakhin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physiology Komi SC UB RAS, Syktyvkar

<sup>2</sup> Ural Federal University, Ekaterinburg

<sup>3</sup> Institute of Organic Synthesis named after I.Ya. Postovskiy UB RAS, Ekaterinburg

In present article we report the effects of 1,3,4-thiadiazine class derivatives, such as L-2, L-4, L-6 synthesized in Ural federal University under the leadership of academician O.N. Chupahin on the mitochondrial succinate dehydrogenase of rat liver in vitro. It is shown that unlike L-6 substance which has no significant effect on enzyme activity, L-2 and L-4 compounds inhibit succinate dehydrogenase to varying degrees, reducing its activity in the 2 and 4-fold, respectively, compared with native mitochondria (p < 0.001). We believe that the detected difference is due to the presence of various functional groups in the chemical structure of the 1,3,4-thiadiazine class derivatives.

Key words: *mitochondria, thiadiazine, succinate dehydrogenase*

---

Nadezhda Alisultanova, Minor Research Fellow. E-mail: [alisultanova.nadezhda@mail.ru](mailto:alisultanova.nadezhda@mail.ru)

Nadezhda Vakhnina, Candidate of Biology, Research Fellow. E-mail: [vakhnina80@mail.ru](mailto:vakhnina80@mail.ru)

Vera Shadrina, Candidate of Biology, Research Fellow. E-mail: [Vera.shadrina56@mail.ru](mailto:Vera.shadrina56@mail.ru)

Evgeniy Boyko, Doctor of Medicine, Professor, Chief of the Department of Ecological and Medical Physiology. E-mail: [erbojko@physiol.komisc.ru](mailto:erbojko@physiol.komisc.ru)

Larisa Sidorova, Candidate of Chemistry, Associate Professor. E-mail: [vlapp@isnet.ru](mailto:vlapp@isnet.ru)

Oleg Chupakhin, Academician of RAS, Research Supervisor of the Institute. E-mail: [chupakhin@ios.uran.ru](mailto:chupakhin@ios.uran.ru)