

Л. В. Татьянаенко, Р. А. Котельникова, Д. А. Полетаева, О. В. Доброхотова, И. Ю. Пихтелева, А. Б. Корнев, Е. А. Хакина, П. А. Трошин, А. И. Котельников

## ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА НА АКТИВНОСТЬ $Ca^{2+}$ -АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Институт проблем химической физики РАН, Московская область, г. Черноголовка, Россия, e-mail: kotel@icp.ac.ru

Исследовано влияние новых производных фуллерена на функцию гидролаз:  $Ca^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ). Показано, что большинство исследованных производных фуллерена ингибируют активность обоих ферментов. Так, соединения ППФ-I, ППФ-II и ППФ-III полностью тормозят активный транспорт  $Ca^{2+}$  в 0,009 мМ концентрации и лишь на  $(55 \pm 6) \%$ ,  $(42 \pm 8) \%$  и  $(60 \pm 6) \%$  соответственно ингибируют гидролиз АТФ, тем самым разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента. Это вызывает изменение соотношения вне- и внутриклеточного содержания ионов  $Ca^{2+}$  и влияет на адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров. Соединение ППФ-III неконкурентно и обратимо действует на гидролитическую функцию  $Ca^{2+}$ -АТФазы СР с  $K_i = 1,6 \cdot 10^{-6}$  М. Все исследованные производные фуллерена тормозят функцию ФДЭ цГМФ и способны вызывать антиагрегационный эффект за счет накопления субстрата ФДЭ цГМФ — цГМФ — вторичного мессенжера живых организмов. Полученные данные позволяют прогнозировать возможный лекарственный эффект изучаемых производных фуллерена.

**Ключевые слова:**  $Ca^{2+}$  —  $Mg^{2+}$  АТФаза саркоплазматического ретикулума, фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата, полизамещенные производные фуллерена.

Целью настоящего исследования является изучение влияния водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов (ППФ) (рис. 1) на каталитическую активность гидролаз:  $Ca^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума ( $Ca^{2+}$ -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ). Соединения ППФ I – V, VII, VIII были синтезированы и охарактеризованы в работе [1], соединение VI — в работе [2].

Известно, что  $Ca^{2+}$ -АТФаза СР катализирует активный транспорт ионов  $Ca^{2+}$  через биологические мембраны за счет гидролиза субстрата фермента АТФ. Ингибирование активного транспорта ионов  $Ca^{2+}$  через мембрану СР нарушает соотношение концентрации ионов кальция внутри и вне клеток [3, 4], что играет важную роль в процессах образования тромбов и адгезии метастатических клеток к эндотелию капилляров [5]. В ряде работ показано, что одним из механизмов антимагистатического эффекта соединений является ингибирование активного транспорта ионов Са через биомембраны [6, 7], что подтверждается высокой корреляцией данных, полученных в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [8].

ФДЭ цГМФ расщепляет субстрат цГМФ, который участвует в важных процессах жизнедеятельности организма, дифференциации клеток, пролиферации [9], определяет антиагрегационные, антигипертензивные и вазодилаторные функции организма [10 – 12]. Поэтому ингибиторы функции ФДЭ цГМФ представляют

большой интерес в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Исследование влияния ППФ на функцию  $Ca^{2+}$ -АТФазы СР и ФДЭ цГМФ способствуют выявлению молекулярных механизмов их биологического действия, позволяющих отбирать среди этого класса соединений потенциальные лекарственные препараты антимагистатического и антиагрегационного спектров действия.

### Экспериментальная часть

В работе использовались альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидаза (яд кобры), АТФ производства фирмы “Sigma”, а также гистидин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трихлоруксусная кислота (ТХУ), сахароза, соли  $MgCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$ , Na оксалат, молибдат аммония фирмы “Реахим” (Россия) после соответствующей дополнительной очистки.

Фермент  $Ca^{2+}$ -АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов [13]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (0,5 л раствора на 100 г мышц) в присутствии 10 мМ ЭДТА, pH 7,5. Мышцы измельчали, помещали в среду, содержащую 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 10 % сахарозе, pH 7,0 и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера.

Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 6 слоёв марли. Фильтрат центри-

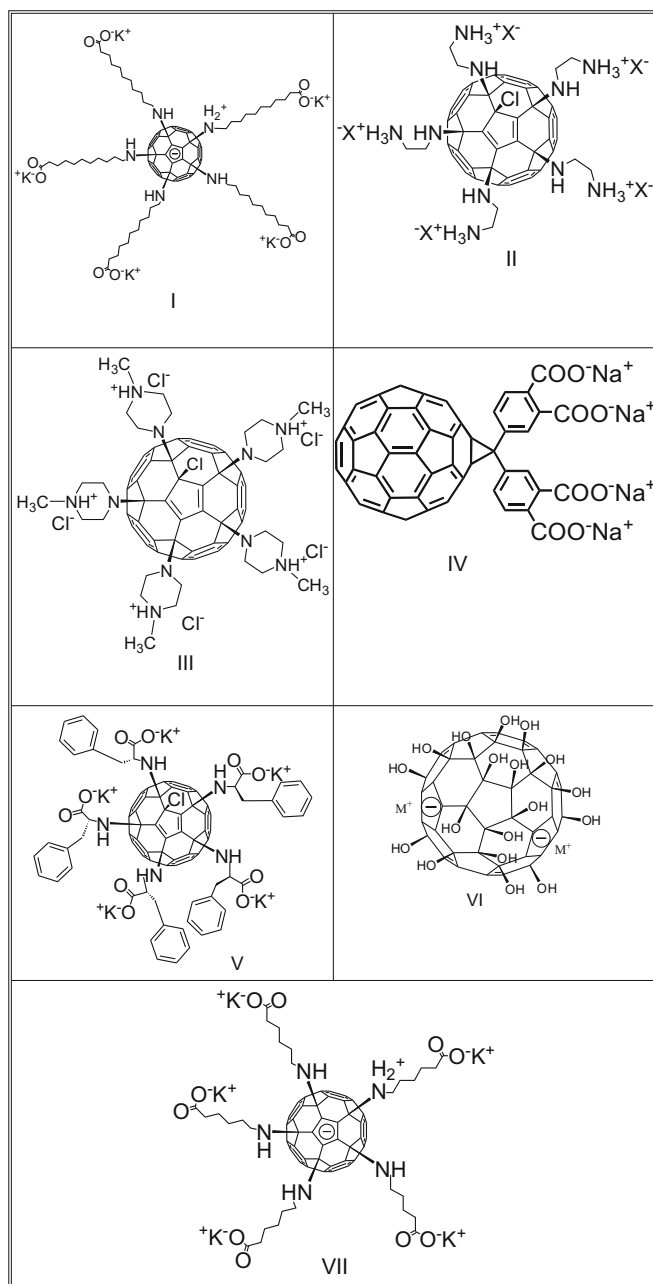


Рис. 1. Структурные формулы водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов.

фуговали при 36000 г в течение 60 мин. Осадок суспензировали в среде, содержащей 0,6 М КСl и 10 мМ гистидина при рН 7,0 – 7,2, а затем измельчали в гомогенизаторе Поттера, к полученному гомогенату добавляли альбумин человека и инкубировали при постоянном перемешивании в холодильнике в течение 8 – 10 ч. Затем гомогенат центрифугировали при 40000 г в течение 90 мин. Из центрифужных пробирок отбирали средний желеобразный слой, который суспензировали в среде, содержащей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30 % сахарозе, рН 7,0. Полученный таким образом ферментный препарат замораживали в жидком азоте. Удельная активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР составляла 15000 нмоль неорганического фосфата, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Кон-

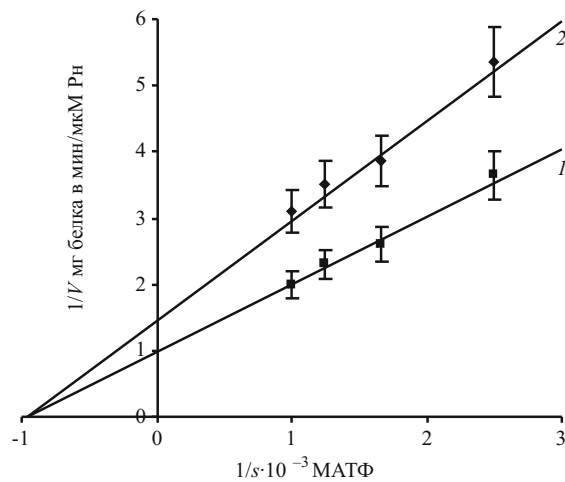


Рис. 2. Изменение скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата под влиянием соединения III в координатах Лайнуивера — Берка: 1 — контроль; 2 — в присутствии соединения III в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М.

центрацию белка определяли по модифицированной методике Лоури [14].

Реакционная среда содержала 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, 5 мМ оксалата Na, 0,04 мг белка, 3 мМ АТФ при рН 7,2. Реакцию индуцировали добавлением 0,1 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы определяли по кинетике изменения рН образцов. Гидролитическую активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона касательной к начальному участку кривой, описывающей кинетику накопления неорганического фосфата в результате гидролиза АТФ. О скорости изменения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  судили по времени их полного поглощения визикулами СР, что приводит к прекращению реакции гидролиза АТФ. Относительную активность фермента рассчитывали по формуле  $I = 100(A_0 - A)/A_0$ , где  $I$  — относительная активность фермента;  $A_0$  — удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе;  $A$  — удельное содержание неорганического фосфата в опытной пробе, содержащей химическое соединение.

Кинетику ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР исследовали по зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ) в присутствии и в отсутствие исследованного соединения III в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М [15].

Обратимость ингибирования определяли путем диализа раствора фермента  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР, содержащего исследуемые ППФ в концентрации  $9,4 \cdot 10^{-6}$  М. Диализ проводился против 200 мл инкубационной среды в течении 24 ч при 4 – 5 °С в отсутствие фуллереновых производных.

ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс [16]. Ткань головного мозга крыс гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по массе количестве охлажденного 0,2 М трис-НСl буфера, рН 7,5. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40000 г на центрифуге К-32М. Надосадочную жидкость, содержащую фермент, замораживали в жидком

Влияние фуллеренов на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР

Соединение ППФ	Торможение гидролитической и транспортной функции $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР									
	Концентрации, М									
	$9,4 \cdot 10^{-6}$		$5 \cdot 10^{-6}$		$5 \cdot 10^{-6}$		$2 \cdot 10^{-6}$		$2 \cdot 10^{-7}$	
	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ
I	100 ± 10	55 ± 6*	60 ± 6	30 ± 3*	47 ± 5	17 ± 1*	25 ± 2	17 ± 2	0	0
II	100 ± 10	42 ± 8*	-	-	53 ± 5	30 ± 3*	0	0	-	-
III	100 ± 10	60 ± 6*	78 ± 8	50 ± 5*	50 ± 5	33 ± 3*	-	-	0	0
IV	-	-	100 ± 10	100 ± 10	-	-	75 ± 8	51 ± 6*	56 ± 6	20 ± 2*
V	-	-	-	-	24 ± 2	29 ± 3	13 ± 1	10 ± 1	8 ± 0,8	3 ± 0,3
VI	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-
VII	57 ± 8	52 ± 5	20 ± 2	38 ± 4	18 ± 2	33 ± 3	14 ± 1	11 ± 1	0	0

**Примечание:** приведены процентные значения по торможению гидролитической и транспортной функции  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР (данные 4 – 6 опытов для каждого соединения) ( $M \pm m$ ) %.

Преинкубация комплекса с  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой СР — 3 мин.

\*  $P < 0,01$  по сравнению с транспортной функцией фермента.

Прочерки означают отсутствие данных у исследованного комплекса.

Таблица 2

Обратимость действия соединений ППФ-III на функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР

Соединение ППФ	Ингибирование активности $\text{Ca}^{2+}$ АТФазы СР, % от контроля			
	до диализа		после диализа	
	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ	Активный транспорт $\text{Ca}^{2+}$	Гидролиз АТФ
III	100 ± 6*	60 ± 6*	20 ± 2*	0*

**Примечание:** концентрация III в пробе  $9,4 \cdot 10^{-6}$  М.

Приведены процентные значения торможения активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР (данные 3 – 4 опытов) ( $M \pm m$ ) %.

\*  $p < 0,01$  после диализа.

азоте. Удельная активность ФДЭцГМФ составляла 7 мкМ Рн/мг белка в мин. Активность ФДЭцГМФ определяли по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, которое равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из

ГМФ при добавлении нуклеотидазы [16]. При определении активности ФДЭ цГМФ количество неорганического фосфата, накапливающегося в процессе ферментативной реакции, определяли спектроскопическим методом при длине волны  $\alpha = 375$  нМ с использованием спектрофотометра “Specord M-40” (фирма “Карл Цейс”)

Таблица 3

## Влияние фуллеренов на активность ФДЭ цГМФ

Соединение ППФ	Торможение активности ФДЭ цГМФ, % от контроля		
	Концентрации соединений, М		
	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
I	85 ± 8*	25 ± 2	14 ± 1
II	80 ± 8*	55 ± 6	13 ± 1
III	78 ± 8*	36 ± 4	11 ± 1
IV	98 ± 9*	42 ± 4	26 ± 3
V	64 ± 6	19 ± 2	1 ± 0,1
VI	92 ± 9*	66 ± 7*	24 ± 2
VII	57 ± 6	27 ± 3	16 ± 2

**Примечание:** приведены процентные значения торможения активности ФДЭ цГМФ производными фуллеренов (данные 4 – 6 опытов для каждого препарата) ( $M \pm m$ ) %;

\*  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

## Результаты и их обсуждение

Влияние ППФ (табл. 1) на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР и ФДЭ цГМФ исследовали после предварительной преинкубации соединений с ферментом. Как видно из табл. 1, соединения I – III полностью тормозят активный транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой СР в концентрации  $9,4 \cdot 10^{-6}$  М и лишь на (55 ± 6) %, (42 ± 8) %, (60 ± 6) % соответственно ингибируют гидролиз АТФ, тем самым разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента. Аналогичный разобщающий эффект этих соединений наблюдается в концентрации  $3,8 \cdot 10^{-6}$  М. Соединение IV на 100 % тормозит гидролитическую и транспортную функции фермента в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$ , а в концентрациях  $2 \cdot 10^{-6}$  М и  $2 \cdot 10^{-7}$  М на (75 ± 8) % и (56 ± 6) % тормозит актив-

ный транспорт ионов кальция и на  $(51 \pm 6) \%$  и  $(20 \pm 2) \%$  соответственно ингибируют гидролиз АТФ.

Наблюдаются ингибирующие эффекты на функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы соединения VIII, но разобщающего действия на активный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  и гидролиз АТФ не наблюдается (табл. 1). Практически не влияют на работу фермента соединения V; VI; VII.

Полученные данные позволяют предполагать выраженный антимагистатический эффект соединений I – III, а также IV [7, 8, 17].

Важной характеристикой механизма действия ППФ является выявление обратимости их действия на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР. Как видно из табл. 2, гидролитическая и транспортная функции III после диализа в значительной степени восстанавливаются. Это свидетельствует о том, что соединение III является обратимым ингибитором функции  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР. Следовательно, III нековалентно связывается с ферментом.

О характере связывания фермента с ингибитором III судили по характеру зависимости обратных значений скорости ферментативной реакции  $(1/v)$  от концентрации субстрата  $(1/s)$  ( $1 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-4}$  М) в присутствии исследуемого ингибитора. Используя численные значения максимальных скоростей процесса гидролиза АТФ, рассчитывали константу ингибирования ( $K_i$ ) под влиянием III в концентрации  $5 \cdot 10^{-6}$  М [15]. Как видно из рис. 2, III неконкурентно тормозит гидролитическую функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СР с  $K_i = 1,6 \cdot 10^{-6}$  М, что свидетельствует о том, что III не связывается с активным центром фермента.

Как видно из табл. 3, все исследованные производные фуллеренов тормозят функцию ФДЭ цГМФ. Этот результат позволяет предположить наличие антиагрегационного эффекта при их действии. Это связано со способностью водорастворимых ППФ ингибировать ФДЭ цГМФ и накапливать в организме один из важнейших мессенжеров метаболизма — цГМФ [12].

Как видно из табл. 2, соединения I – IV, VI, VIII в концентрации 0,1 мМ эффективно ингибируют ФДЭ цГМФ.

Полученные результаты позволяют предположить, что вышеперечисленные соединения будут обладать

выраженным антиагрегационным терапевтическим действием. Остальные соединения — V, VII — ингибируют каталитическую функцию ФДЭ цГМФ значительно меньше.

Таким образом, полученные результаты позволяют прогнозировать у изучаемых водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов наличие антимагистатической и антиагрегационной активности, что обуславливает интерес к их углубленному изучению в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. B. Kornev, E. A. Khakina, S. I., et al., *Chem. Commun.*, **48**, 5461 – 5463 (2012).
2. A. G. Bobylev, A. B. Kornev, L. G. Bobyleva, et al., *Org. Biomol.*, **9**, 5714 – 5719 (2011).
3. K. Honn, J. Onoda, C. Diglio, B. Sloane, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **174**, 16 – 17 (1983).
4. G. A. Schmark, A. M. Levfer, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 178 – 177 (1982).
5. F. Fidler, *Cancer Res.*, **50**, 6130 – 6138 (1990).
6. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *News Let.*, **4**(2), 3 – 6 (1997).
7. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *Neoplasma*, **44**(6), 361 – 365 (1997).
8. Л. В. Татьяненко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов и др., *Ж. биомед. химии*, **52**(1), 52 – 61 (2006).
9. F. Rind, *Modern Drug Discoveri, Nov / Dec*, **31**, 511 (1998).
10. О. Г. Бусыгина, Е. Л. Лебедева, И. С. Северина, *Вопр. мед. химии*, **5**, 24 – 26 (1990).
11. Ш. Г. Бусыгина, И. С. Северина, *Биохимия*, **55**(10), 1812 – 1818 (1990).
12. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вузовская книга, Москва (2004), сс. 60 – 61.
13. В. Б. Ритов, В. М. Мельгунов, П. Г. Комаров, *Докл. АН СССР*, **233**, 730 – 733 (1977).
14. Д. Бейли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1980), с. 53.
15. И. В. Березин, А. А. Классов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, Из-во МГУ, Москва (1973), сс. 77 – 84.
16. Р. Е. Либензон, Т. Т. Щеколдина, О. Е. Ватолкина, *Вопросы мед. химии*, **4**, 526 – 530 (1977).
17. Н. П. Коновалова, *Технол. живых систем*, **1**(3), 42 – 48 (2004).

Поступила 11.07.12

## EFFECT OF WATER-SOLUBLE POLYSUBSTITUTED FULLERENE DERIVATIVES ON $\text{Ca}^{2+}$ ATPase ACTIVITY IN SARCOPLASMIC RETICULUM AND cGMP PHOSPHODIESTERASE

L. V. Tat'yanyenko, R. A. Kotel'nikova, L. A. Poletaeva, O. V. Dobrokhotova, I. Yu. Pikhteleva, A. B. Kornev, E. A. Khakina, P. A. Troshin, and A. I. Kotel'nikov\*

Institute for Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia;

\* e-mail: kotel@icp.ac.ru

The effect of new fullerene derivatives on the function of hydrolases, including  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase of sarcoplasmic reticulum and cGMP phosphodiesterase, has been studied. It is established that most of the polysubstituted fullerene derivatives (PFDs) studied inhibit the activity of both enzymes. In particular, compounds PFD-I, PFD-II, and PFD-III completely suppress the active transport of  $\text{Ca}^{2+}$  at 0.009 mM concentration and inhibit ATP hydrolysis (by  $55 \pm 6\%$ ,  $42 \pm 8\%$ , and  $60 \pm 6\%$ , respectively), thus separating the hydrolytic and transport functions of ATPase. This leads to a change in the relative content of extra- and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ions and influences the adhesion of metastatic cells to capillary endothelium. Compound PFD-III is uncompetitive and reversibly changes the hydrolytic function of  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase in sarcoplasmic reticulum with  $K_i = 1.6 \times 10^{-6}$  M. All PFDs suppress the function of cGMP phosphodiesterase and can produce the antiaggregant effect due to accumulation of the substrate (cGMP), which is a secondary messenger in living organisms. These data allow the possible pharmacological effects of PFDs to be predicted.

**Keywords:**  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase of sarcoplasmic reticulum, cGMP phosphodiesterase, polysubstituted fullerene derivatives