

Л. В. Татьянаенко¹, О. В. Доброхотова¹, Р. А. Котельникова¹,
Д. А. Полетаева¹, Д. В. Мищенко¹, И. Ю. Пихтелева¹, Г. Н. Богданов¹,
В. С. Романова², А. И. Котельников¹

ВЛИЯНИЕ НИТРОКСИЛАЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНИЛПРОЛИНА НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

¹ Институт проблем химической физики РАН, Московская область, г. Черноголовка, Россия,
e-mail: roman@ineos.ac.ru;

² Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

Исследовано влияние нитроксильных производных метилового эфира фуллеренилпролина на ферментативную активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР). Показано, что гибридные производные фуллерена C_{60} являются ингибиторами Ca^{2+} -АТФазы СР. При этом мононитрат тормозит гидролитическую активность фермента с $K_i = 1,92 \cdot 10^{-6}$ М, а активный транспорт Ca^{2+} с $K_i = 3,79 \cdot 10^{-6}$ М. Динитрат ингибирует гидролиз АТФ с $K_i = 2,38 \cdot 10^{-8}$ М, а транспорт Ca^{2+} с $K_i = 3,08 \cdot 10^{-8}$ М. Метилловый эфир фуллеренилпролина не влияет на активность Ca^{2+} -АТФазы. Полученные данные позволяют прогнозировать область возможного применения изученных гибридных производных фуллерена в качестве потенциальных лекарственных средств.

Ключевые слова: Ca^{2+} - Mg^{2+} АТФаза саркоплазматического ретикулума, фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата, нитраты фуллеренилпролина.

Нанотехнологические разработки и достижения при функционализации наноуглеродных материалов привели к созданию новых фармакологически активных веществ на основе фуллерена C_{60} . Амфифильные производные C_{60} , вследствие наличия в них уникального наноуглеродного сфероида, обладают высокой мембранотропностью, что определяет их фармакокинетические особенности, в первую очередь, проницаемость через липидный бислой биологических мембран, а также изменения активности мембраносвязанных ферментов. Целью работы являлось исследование модуляции активности Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) под влиянием недавно синтезированных гибридных производных фуллерена.

Известно, что с участием Ca^{2+} -АТФазы реализуются молекулярные механизмы лекарственной резистентности [1] и антиметастатического действия многих цитостатиков [2 – 5].

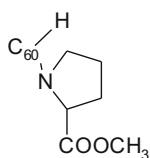
Экспериментальная часть

В работе использованы альбумин человека, имидазол, убаин, цГМФ, нуклеотидаза (яд кобры), АТФ производства фирмы “Sigma”; гистидин, диметилсульфоксид (ДМСО), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трихлоруксусная кислота (ТХУ), сахароза, соли MgCl_2 , NaCl , KCl , CaCl_2 , Na оксалат, молибдат

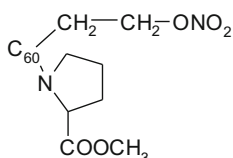
аммония фирмы «Реахим», Россия, после соответствующей дополнительной очистки.

Синтез производных фуллерена выполнен поэтапно путем нуклеофильного эквиволярного присоединения пролина к фуллерену с образованием фуллеренилпролина I и последующего электрофильного замещения гидрофуллеренильного протона нитроксилалкилгалогенидами [6].

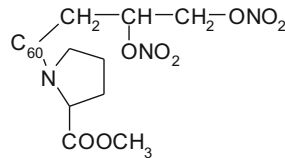
Фермент Ca^{2+} -АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов [7]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (0,5 л раствора на 100 г мышц) в присутствии 10 мМ ЭДТА, pH 7,5. Мышцы измельчали, помещали в среду, содержащую 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 10 % сахарозе, pH 7,0 и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 6 слоёв марли. Фильтрат центрифугировали при 36000 об/мин 60 мин. Осадок суспендировали в среде, содержащей 0,6 М KCl и 10 мМ гистидина при pH 7,0 – 7,2 и добавляли 100 мг альбумина человека и инкубировали в течение 8 ч при 4 – 8 °С и перемешивании. Затем гомогенат центрифугировали при 40000 об/мин в течение 90 мин. Из центрифужных пробирок отбирали средний желеобразный слой, который суспендировали в среде, содержащей



фуллеренил-пролин (I)



фуллеренил-мононитрат (II)



фуллеренил-динитрат (III)

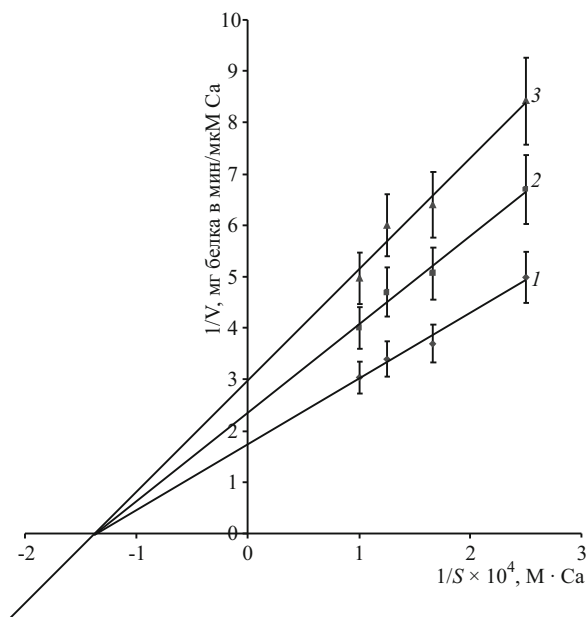


Рис. 1. Изменение скорости активного транспорта Ca^{2+} от его концентрации под влиянием соединений II и III в координатах Лайнуивера — Берка: 1 — контроль, 2 — в присутствии фуллеренил мононитрата $5 \cdot 10^{-6}$ М, 3 — в присутствии фуллеренил динитрата $4 \cdot 10^{-8}$ М

щей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30 % сахарозе, рН 7,0. Полученный таким образом ферментный препарат замораживали в жидком азоте и использовали в работе.

Активность фермента определяли по методу [6]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl , 5 мМ оксалата Na , 0,04 мг белка, 3 мМ АТФ, рН 7,2. Реакцию индуцировали добавлением 0,1 мМ CaCl_2 . Гетеролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы рассчитывали по тангенсу угла наклона начального участка кинетической кривой гидролиза АТФ. Удельная скорость гидролиза Ca^{2+} -АТФазы составляла 15000 нМ Рн/мг белка/мин. Скорость изменения концентрации ионов кальция оценивали по их поглощению (из добавленного 0,1 мМ CaCl_2) везикулами СР за время протекания гидролиза АТФ.

Ингибирование гидролитической активности ферментов рассчитывали по формуле:

$$I = 100(A_0 - A)/A_0,$$

где I — индекс ингибирования в процентах; A_0 — удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе; A — удельное содержание неорганического фосфора в опытной пробе.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури.

Кинетику ингибирования Ca^{2+} -АТФазы СР исследовали по зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ) в присутствии и в отсутствие исследованных моно- и динитратов в концентрациях $5 \cdot 10^{-6}$ М и $4 \cdot 10^{-8}$ М соответственно.

Обратимость действия исследованных соединений определяли путём диализа раствора Ca^{2+} -АТФазы СР,

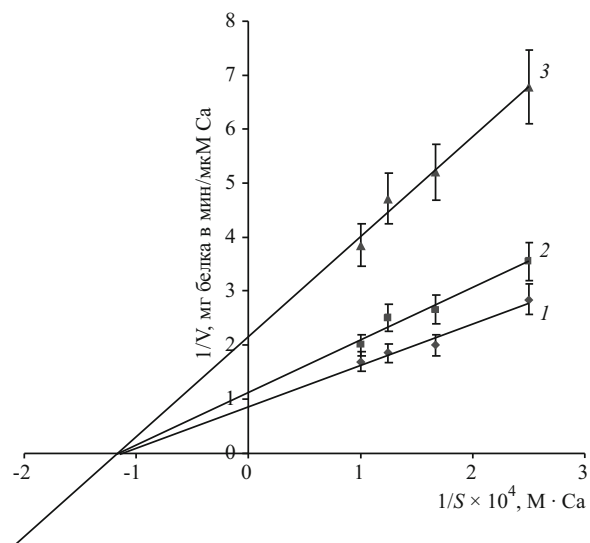


Рис. 2. Изменение скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата под влиянием соединений II и III в координатах Лайнуивера-Берка: 1 — контроль, 2 — в присутствии фуллеренил мононитрата $5 \cdot 10^{-6}$ М, 3 — в присутствии фуллеренил динитрата $4 \cdot 10^{-8}$ М.

содержащего 1 мкМ соединений II или III, растворённых в воде. Диализ проводили против 100-кратного избытка среды инкубации в отсутствие комплексов в течение 24 ч при 4 – 5 °С.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, фуллеренил мононитрат II и фуллеренил динитрат III в отличие от исходного фуллеренилпролина I, проявляют выраженную ингибирующую активность на функцию Ca^{2+} -АТФазы СР. Так, соединение III в концентрации 1 мкМ почти полностью (на 97 %) тормозит активный транспорт ионов Ca^{2+} , гидролиз АТФ ингибирует на 87 %, а в концентрации 0,01 мкМ — на 60 и 50 % соответственно. Соединение II в концентрации 1 мкМ ингибирует гидролитическую и транспортную функции фермента на 56 и 44 % соответственно.

Важной характеристикой механизма ингибирования изученными соединениями является обратимость их действия на активность Ca^{2+} -АТФазы.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что после диализа транспортная функция фермента под влиянием соединений II и III частично восстанавливается. Это свидетельствует о том, что эти соединения являются частично обратимыми ингибиторами функции Ca^{2+} -АТФазы, что указывает на их нековалентное связывание с активным центром фермента.

Более полное представление о механизме ингибирования Ca^{2+} -АТФазы даёт кинетический метод исследования ферментативных реакций, позволяющий судить о характере связывания фермента с ингибитором. Влияние ингибитора на активность фермента определяется зависимостью обратных значений скорости ферментативной реакции ($1/V$) от концентрации субстрата ($1/S$) в присутствии исследуемого ингибитора.

Влияние производных фуллерена на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулаума мышц кроликов

Соединение	Активность Ca^{2+} -АТФазы СР, % от контроля					
	Концентрация соединений:					
	1 мкМ		0,1 мкМ		0,01 мкМ	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
I ($n = 6$)	100	100	100	100	100	100
II ($n = 6$)	44 ± 4*	56 ± 5*	60 ± 6*	69 ± 5*	67 ± 6*	83 ± 7*
III ($n = 6$)	3 ± 0,3*	13 ± 1*	23 ± 2*	38 ± 4*	40 ± 4*	52 ± 5*

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

Таблица 2

Влияние производных фуллерена на гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы СР до и после диализа

Соединение	Активность Ca^{2+} -АТФазы СР, % от контроля			
	До диализа		После диализа	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
II ($n = 6$)	44 ± 4	46 ± 2	75 ± 7 *	80 ± 8 *
III ($n = 6$)	3 ± 0,3	13 ± 1	60 ± 6*	44 ± 5*

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

По численным значениям максимальных скоростей процессов гидролиза АТФ и активного трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} рассчитывали соответствующие константы ингибирования (K_i) под влиянием соединений II и III. Расчет проводили по значениям тангенса угла наклона прямых Лайнуивера — Берка (рис. 1 и 2), которые при ингибировании в $(1 + [I]/K_i)$ раз больше по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора [8]. Для гидролиза АТФ $K_i = 1,92 \cdot 10^{-6}$ М, а для активного транспорта ионов кальция $K_i = 3,79 \cdot 10^{-6}$ М.

Из представленных на рис. 1 и 2 данных следует, что соединение II является неконкурентным ингибитором гидролитической и транспортной функции.

Фуллеренил динитрат III, хотя и является близким аналогом II и подобно ему неконкурентно ингибирует обе функции фермента, отличается от мононитрата II меньшими на 2 порядка значениями K_i . В этом случае $K_i = 3,08 \cdot 10^{-8}$ М для гидролиза АТФ и $K_i = 2,38 \cdot 10^{-8}$ М для трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} , что указывает на повышенную чувствительность гидролитической функции фермента к действию III и может свидетельствовать о частичном разобщении функций Ca^{2+} -АТФазы. В связи с этим следует обратить внимание на заметное снижение по сравнению с контролем соотношения $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$, теоретически равного 2. В отсутствие изученных нитратов (контроль) это соотношение допустимо при $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}] \geq 1,8$, что соответствует данным табл. 3. Этот показатель заметно снижается под влиянием фуллеренил-мононитрата II, тогда как фуллеренил-пролин I не оказывает влияния на активность фермента. При этом эффект практически не изменяется при варьировании концентрации II в интервале $10^{-6} - 10^{-8}$ М. В отличие от этого, под влиянием динитрата III наблюдается закономерное снижение соотношения $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$ при увеличении концентрации от 10^{-8} до 10^{-6} М.

Таким образом, соединения II и III, хотя и не связываются с активным центром Ca^{2+} -АТФазы, способны индуцировать некие структурно-функциональные из-

Таблица 3

Влияние производных фуллерена на соотношение $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$

Соединение	Активность Ca^{2+} -АТФазы СР в единицах удельной активности								Отношение $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$			
	Концентрация соединений, М								Контроль	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}							
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ				
Контроль ($n = 6$)	5,6	3,0	—	—	—	—	—	—	1,86	—	—	—
I ($n = 6$)	—	—	5,7	3,2	5,6	3,1	5,65	3,18	—	1,78	1,8	1,8
II ($n = 6$)	—	—	2,5 *	1,7 *	3,4 *	2,1 *	3,7 *	2,5 *	—	1,47	1,55	1,5
III ($n = 6$)	—	—	0,17 *	0,39 *	1,3 *	1,14 *	2,2 *	1,6 *	—	0,44	1,14	1,4

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

менения фермента, опосредующие гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы.

Полученные в данной работе результаты по индуцированному изменению активности Ca^{2+} -АТФазы, связанному с изменением соотношения содержания вне- и внутриклеточного ионов кальция, позволяют предполагать, что изученные производные фуллере-на C_{60} могут обладать антиметастатическими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. П. Коновалова, *Технол. живых систем*, **1**(3), 42 – 48 (2004).

2. В. П. Нифонтов, Л. В. Татьяненко, В. А. Чернов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(5), 522 – 526 (1988).
3. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *News Let.*, **4**(2), 3 – 6 (1997).
4. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *Neoplasta*, **44**(6), 361 – 365 (1997).
5. Л. В. Татьяненко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов и др., *Ж. биомед. химии*, **52**(1), 52 – 61 (2006).
6. А. И. Котельников, В. С. Романова, Г. Н. Богданов и др., Международный патент № PST / RU 2007 / 000337 (2007).
7. В. Б. Ритов, В. М. Мельгунов, П. Г. Комаров, *ДАН СССР*, **233**, 720 – 733 (1977).
8. А. Ленинжер, *Биохимия*, Мир, Москва (1974).

Поступила 17.05.10

EFFECT OF NITROXYALKYL DERIVATIVES OF FULLERENYLPROLINE ON ACTIVITY OF Ca^{2+} -ATPASE OF SARCOPLASMIC RETICULUM

L. V. Tat'yanyenko¹, O. V. Dobrokhotova¹, R. A. Kotel'nikova¹, D. A. Poletayeva¹, D. V. Mishchenko¹, I. Yu. Pikhteleva¹, G. N. Bogdanov¹, V. S. Romanova², and A. I. Kotel'nikov¹

¹ Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Chernogolovka, 142432, Russia;

² Nesmeyanov Institute of Organoelemental Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The effect of nitroxyalkyl derivatives of fullererylproline methyl ether on the enzymatic activity of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum (SR) has been studied. It is shown that hybrid derivatives of C_{60} fullerene are capable of inhibiting the activity of Ca^{2+} -ATPase of SR. Mononitrate inhibits the hydrolytic activity of enzyme at $K_i = 1.92 \cdot 10^{-6}$ M and the active Ca^{2+} transport, at $K_i = 3.79 \cdot 10^{-6}$ M. Dinitrate inhibits ATP hydrolysis at $K_i = 3.08 \cdot 10^{-8}$ M. At the same time, fullererylproline methyl ether does not affect the enzymatic activity of Ca^{2+} -ATPase. Based on these data, it is possible to predict the possible fields of application for hybrid fullerene derivatives as potential drugs.

Key words: Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, phosphodiesterase of cyclic guanosine monophosphate, fullererylproline nitrates