

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2011

Л. В. Татьянаенко, Г. Н. Богданов, О. В. Доброхотова, Д. В. Мищенко,
М. А. Фадеев, Б. С. Федоров

НИТРОКСИАЛКИЛАМИДЫ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ИНГИБИТОРЫ Na/K-АТФазы

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия,
E-mail: mdv@icp.ac.ru

Изучено ингибирующее действие N-нитроксиалкиламидных производных никотинамида (НАПН) на гидролазную активность Na/K-АТФазы. НАПН содержат 2 пептидные связи и фрагменты амидов глицина, β-аланина, α-аминопропанкарбоновой кислоты или γ-аминомасляной кислоты. Установлено, что ингибирующий эффект НАПН зависит от их концентрации и гидрофобности (по мере увеличения гидрофобности НАПН их ингибирующее действие снижается). Наиболее активным ингибитором в ряду НАПН является N-нитроксиэтилникотинамид, неконкурентно и обратимо связывающийся с Na/K-АТФазой с $K_i = 2,13 \cdot 10^{-4}$ М.

Ключевые слова: Na/K-АТФаза, ингибиторы гидролиза АТФ, нитроксиалкиламиды.

В ряду экзогенных доноров оксида азота особую группу образуют нитраты на основе метаболически активных носителей, таких как углеводы и коферменты. Они находят широкое применение в качестве вазодилататоров, регуляторов сердечно-сосудистого гомеостаза и ингибиторов агрегации тромбоцитов [1]. Исследованиями последних лет выявлены различные аспекты их противоопухолевого действия: повышение эффективности цитостатиков, торможение развития метастазов, модуляция чувствительности лекарственно-резистентных опухолей к цитостатической терапии [2]. С целью выявления биохимических механизмов терапевтического действия NO-доноров изучено их влияние на ряд изолированных ферментов метаболизма [3]. В данной работе изучена модуляция активности Na/K-АТФазы при воздействии ряда новых нитроксиалкиламидов никотиновой кислоты [4].

Na/K-АТФаза (ЕС 3.6.3.9.) является одним из наиболее значимых ферментов трансмембранного переноса ионов. Этот энергозависимый фермент цитоплазматической мембраны характеризуется своеобразной стехиометрией натрий-калиевого насоса. При гидролизе 1 молекулы АТФ из клетки выносятся 3 иона Na^+ , а извне в клетку поступают 2 иона K^+ . Внутриклеточная роль ионов калия обусловлена их участием в функционировании многих ферментов метаболизма, в первую очередь тех, которые активируют процессы фосфорилирования с образованием первичных продуктов энергетического обмена, включая процесс гликолиза, основной путь биосинтеза АТФ в малигнизированных клетках. Можно считать целесообразным поиск потенциальных противоопухолевых средств в ряду ингибиторов Na/K-АТФазы, принимая во внима-

ние ее аномально высокую активность в ядрах клеток саркомы [5].

Именно по этой причине целью данной работы явились синтез и изучение ингибирующего действия нитроксиалкиламидных производных никотинамида (НАПН) на гидролазную активность Na/K-АТФазы.

Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ, фосфоенолпируват, NADH, убаин, имидазол, PK/LDH Enzyme фирмы "Sigma", а также сахарозу, ЭДТА, дитиотреитол (ДТТ), MgCl_2 , KCl, NaCl фирмы "Реахим" (после необходимой очистки).

Na/K-АТФазу выделяли из почек свиньи [6]. Медулярный слой почек помещали в охлажденную среду [0,25 моль сахарозы, 3 ммоль гистидина, 3 ммоль ЭДТА и 1 ммоль ДТТ, pH 7, 2]. Ткани измельчали в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. Осадок суспендировали в охлажденной среде, вновь гомогенизировали, добавляя среду до первоначального объема и вторично центрифугировали при 40000 об/мин в течение 30 мин. К полученному осадку прибавляли 10 мл среды и тщательно гомогенизировали до однородной массы. Полученный гомогенат, содержащий фермент, вносили по каплям в жидкий азот и хранили в этой среде до использования.

Среда определения гидролитической активности фермента содержала 100 ммоль NaCl, 10 ммоль KCl, 5 ммоль MgCl_2 , 25 ммоль имидазола, 1 ммоль убаина, а непосредственно перед опытом добавляли 3 ммоль NaATP, 2 ммоль фосфоенолпирувата, 10 ед. PK/LDH и 1 мг Na/K-АТФазы. Реакцию индуцировали введением

0,1 ммоль NADH. Удельную активность Na/K-АТФазы определяли спектрофотометрически ($\lambda = 340$ нм) по расходу NADH в сопряженной реакции восстановления пирувата до лактата по известной методике [6].

Аналогичным методом определяли активность фермента в условиях его ингибирования при действии НАПН. Исследуемые НАПН растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО); в контрольную пробу, не содержащую соединений, добавляли 0,1 мл ДМСО. В реакционную среду добавляли нитроксиалкиламида в концентрациях $10^{-6} - 10^{-4}$ М. Степень ингибирования фермента вычисляли по формуле $J = (A_0 - A) / A_0 \cdot 100\%$, где A_0 — значение удельной активности АТФазы в отсутствие НАПН (контроль) A — удельная активность фермента при действии НАПН (опыт).

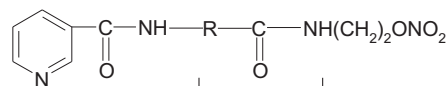
Характер ингибирования Na/K-АТФазы исследовали, сопоставляя зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ) в отсутствие НАПН и в присутствии НАПН в концентрации 10^{-4} М, вызывающих торможение активности Na/K-АТФазы на 50%. Зависимость ферментативной активности Na/K-АТФазы от концентрации субстрата выражали в координатах Лайнуивера — Берка с построением графиков, используя компьютерную программу Calc из пакета OpenOffice 3.2 [7]. Расчет константы ингибирования проводили по значениям тангенса угла наклона прямых Лайнуивера — Берка, которые при ингибировании в $(1 + C_i/K_i)$ раз больше по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора [8].

Обратимость действия исследуемых НАПН определяли путем диализа проб с предварительной инкубацией в течение 30 мин в присутствии 10^{-4} М и в от-

сутствие НАПН в пробах. Диализ проводился против 100-кратного избытка среды инкубации, не содержащей НАПН, в течение 24 ч при 4 – 5 °С.

Результаты и их обсуждение

Осуществлен направленный синтез производных никотинамида общей формулы (I) с 2 пептидными связями и нитроксиэтильной группировкой, донирующей при биотрансформации оксид азота.



где R = $-C_nH_{2n}-$; при $n=1,2,3$ $\begin{matrix} -CH-CH_2- \\ | \\ Ph \end{matrix}$

Эти соединения являются N'-нитроксиэтилзамещенными N-амидоалкилникотинамида. Их синтез включает 2 стадии. Первая — получение амидоалкилникотинамида, а вторая — его N'-нитроксиэтилирование [4], при этом, по нашему мнению, N-амидоалкильные группировки, являясь структурными фрагментами аминокислот, могут повышать потенциальную метаболическую активность никотинамида как известного кофермента реакции прямого переноса атомов водорода, а также функционирование дегидрогеназ (табл. 1).

Выделенный фрагмент соответствует амидам глицина ($n = 1$), β -аланина ($n = 2$), α -аминопропанкарбонной кислоты ($n = 3$) или γ -аминоасляной кислоты и, в принципе, может выступать в качестве структурного элемента белков различного назначения. Особо

Т а б л и ц а 1

Влияние соединений 1 – 5 на гидролазную активность Na/K-АТФазы

Соединение	Нитроксиалкиламид	Удельная активность, мкмоль Р _i /мг белка в мин		
		Концентрация, М		
		10^{-4}	10^{-5}	10^6
1		0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,02
2		0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,32 ± 0,03
3		0,22 ± 0,2	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,02
4		0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,39 ± 0,03
5		0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,41 ± 0,02

Контроль: $A = 0,41$ мкмоль Р_i/мг белка в 1 мин $p < 0,01$. Даны среднеквадратичные ошибки результатов 3 – 4 опытов. $p < 0,01$ по сравнению с контролем (в 0,1 ммоль концентрации).

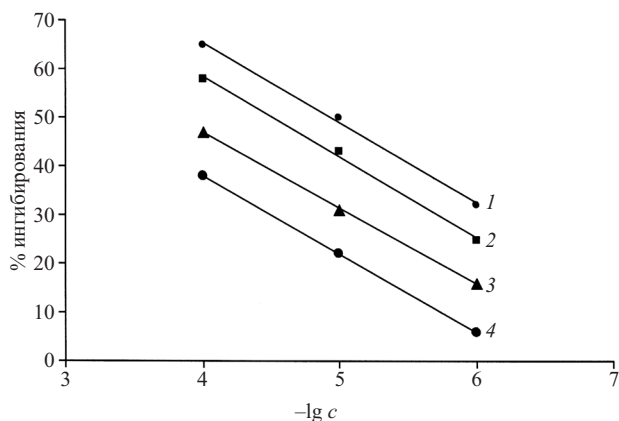


Рис. 1. Зависимость степени ингибирования гидролазной активности Na/K-АТФазы от логарифма концентрации НАПН (1 – 4 номера НАПН из табл. 1).

следует отметить, что γ -аминомасляная кислота входит в число наиболее важных тормозных нейромедиаторов центральной нервной системы. Все эти впервые синтезированные соединения являются близкими аналогами лекарственного препарата никорандила (N'-нитроксиэтилникотинамида), не содержащего выделенного аминокислотного фрагмента.

Из данных табл. 1 видно, что отсутствует какое-либо влияние на активность Na/K-АТФазы в широком диапазоне вводимых концентраций соединения 5 с фенилэтильным фрагментом. Даже в достаточно высокой концентрации 10^{-4} М оно не проявляет ингибирующего действия на фермент. В связи с этим напрашивается предположение об отсутствии контактного взаимодействия препарата с мембраносвязанным ферментом, что может быть обусловлено его высокой гидрофобностью вследствие наличия фенилэтильного фрагмента и невозможности проникать в полярные участки ионной проводимости биомембраны.

Дополнительным аргументом в пользу справедливости этого рассуждения может служить плавное снижение ингибирующего действия других изученных НАПН (2, 3, 4), содержащих метильный, этильный и пропильный фрагменты (т.е. при $n = 1, 2, 3$). В отсутствие выделенного фрагмента, т.е. в случае никорандила, при каждой из концентраций получены наибольшие значения процента ингибирования Na/K-АТФазы. При 10^{-4} М достигается 64 ± 5 % подавления ферментативной активности.

Сопоставление численных значений степени ингибирования ферментативного гидролиза АТФ и логарифма концентрации НАПН представлено на рис. 1. Прямопропорциональная зависимость между ними и одинаковые значения углового коэффициента указывают на высокое сходство молекулярных механизмов влияния этих НАПН на ферментативный гидролиз АТФ.

Влияние ингибиторов энергозависимых процессов трансмембранного переноса ионов сопряжено со структурно-динамическими изменениями цитоплазма-

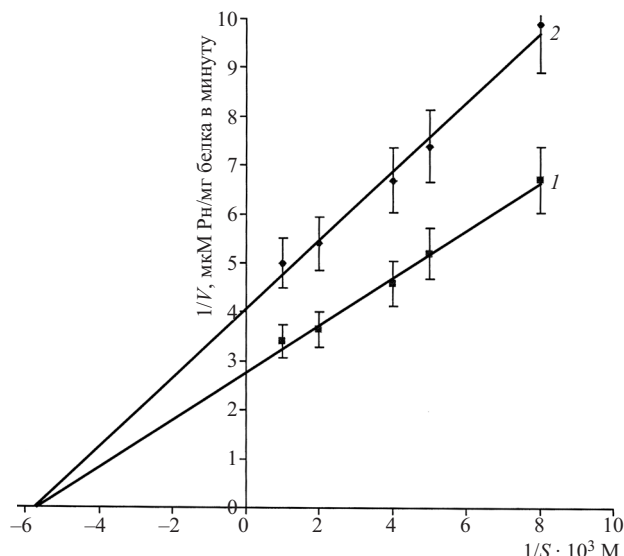


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка: 1 — контроль; 2 — никорандил, 10^{-4} М.

тической мембраны, в структуру которой в качестве интегрального белка входит Na/K-АТФаза.

Наиболее полное представление о механизме ингибирования того или иного фермента дает кинетический метод исследования ферментативной реакции. Он позволяет судить о непосредственном или опосредованном участии в ней активного центра фермента, а также о характере его связывания с ингибиторами. В соответствии с теорией кинетики ферментативных процессов выводы о природе ингибирующего действия НАПН на Na/K-АТФазы были сделаны на основании линейных анаморфоз кинетических кривых по Лайнуиверу-Берку, связывающих обратные значения скорости ферментативной реакции и концентрации субстрата в отсутствие и присутствии никорандила как наиболее активного из изученных НАПН.

Как следует из рис. 2, процесс ингибирования Na/K-АТФазы никорандилом является неконкурентным, когда равновероятными оказываются процессы связывания ингибитора с ферментом или фермент-субстратным комплексом. Расчет проводили по значениям тангенса угла наклона прямых Лайнуивера — Берка (рис. 2), которые при ингибировании в $(1 + C_i/K_i)$ раз больше по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора, так что $\text{tg}\alpha_k/\text{tg}\alpha_0 = 1 + C_i/K_i$. От-

Таблица 2
Обратимость ингибирующего действия Na/K-АТФазы

№ НАПН из табл. 1	Ингибирование активности, % от контроля	
	до диализа	после диализа
1	50 ± 5	0
2	53 ± 6	10 ± 1
3	49 ± 5	15 ± 2

Даны среднеквадратичные ошибки результатов 3 – 4 опытов.
 $p < 0,01$ по сравнению с опытами после диализа.

сюда следует: $K_i = C_i / (\text{tg}\alpha_k / \text{tg}\alpha_0 - 1)$, где $\text{tg}\alpha_k$ и $\text{tg}\alpha_0$ — значения тангенсов углов наклона прямых в отсутствие и присутствии ингибиторов, C_i — концентрация ингибитора, K_i — константа ингибирования. Значение константы ингибирования составляет $2,13 \cdot 10^{-4}$ М. При этом связывание никорандила является почти полностью обратимым, что подтверждают данные табл. 2 о значительном снижении степени ингибирования процесса гидролиза после диализа проб. Это означает, что никорандил нековалентно, хотя и достаточно прочно, связывается с ферментом или фермент-субстратным комплексом.

Таким образом, нитроксиалкильные производные никотинамида с пептидными связями являются умеренными ингибиторами Na/K-АТФазы. По степени ингибирования гидролазной активности они уступают никорандилу, своему близкому структурному аналогу, известному вазодилататору.

Показано, что по мере снижения гидрофобности алкиламидных заместителей постепенно возрастает ингибирующее действие НАПН на гидролитическую активность Na/K-АТФазы.

При создании более эффективных ингибиторов Na/K-АТФазы в ряду производных никотинамида следует учитывать, что их активность зависит от гидрофильно-липофильного баланса.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота. Новый путь к поиску лекарств*, Вузовская книга, Москва (2004).
2. Н. П. Коновалова, *Технол. живых систем*, **1**(3), 42 – 47 (2004).
3. Т. А. Раевская, Л. В. Татьянаенко, С. А. Гончарова, Н. П. Коновалова, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **145**(8), 165 – 169 (2008).
4. Б. С. Федоров, М. А. Фадеев, В. В. Аракчеева, А. Б. Еремеев, Патент РФ № 214301 (2000).
5. Н. П. Карузина, *Вопр. мед. химии*, **5**, 142 – 153, (1983).
6. P. L. Jorgensen, *Biophys. Acta*, **356**, 36 – 52 (1974).
7. H. Fotis, L. V. Tatianenko, L. A. Vasilets, *Eur. J. Biochem*, **269**, 904 – 916 (1999).
8. И. В. Березин, А. А. Клесов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, МГУ, Москва (1976).

Поступила 17.11.10

NICOTINIC ACID NITROXYALKYLAMIDES AS Na/K ATPASE INHIBITORS

L. V. Tat'yanenko, G. N. Bogdanov, O. V. Dobrokhotova, D. V. Mishchenko*, M. A. Fadeev, and B. S. Fedorov

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

*e-mail: mdv@icp.ac.ru

The inhibitory action of nicotinamide N-nitroxyalkylamide derivatives (NANDs) on hydrolase activity of Na/K-ATPase was studied. NANDs contain two peptide bonds and fragments of amides of glycine, β -alanine, α -aminopropanecarboxylic acids, or γ -aminobutyric acid. It is established that the inhibitory effect of NANDs depends of the concentration and hydrophobicity. An increases in the hydrophobicity of NANDs is accompanied by a decreases in their inhibitory action. The most active inhibitor among NANDs studied is N-nitroxyethylnicotinamide, which noncompetitively and reversibly interacts with Na/K-ATPase at $K_i = 2.13 \times 10^{-4}$ M.

Key words: Na/K-ATPase, inhibitors of ATP hydrolysis, nicotinamide nitroxyalkylamide derivatives (NANDs)