

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

© Коллектив авторов, 2013

Л. В. Татьянаенко, О. В. Доброхотова, А. И. Котельников, Н. А. Санина,
Г. И. Козуб, Т. А. Кондратьева, С. М. Алдошин

ВЛИЯНИЕ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА — ДОНОРОВ NO НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Институт проблем химической физики Российской академии наук, Московская обл.,
г. Черноголовка, Россия, e-mail:kotel@icp.ac.ru

Исследовано влияние нитрозильных комплексов железа различных структурных типов на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭцГМФ). Показано, что нитрозильные комплексы железа с органическими лигандами модулируют функцию обоих ферментов. Они эффективно тормозят гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы СР в концентрациях 0,1 – 0,01 мМ, а также разобщают гидролиз АТФ и активный транспорт Ca^{2+} в концентрациях 0,01 – 0,0001 мМ, нарушая баланс ионов Ca^{2+} в клетках, что влияет на образование тромбов и адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров. Соединение $[Fe(SC(NH_2)_2(NO)_2)_2][Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]$ неконкурентно и обратимо тормозит функцию Ca^{2+} -АТФазы СР, с $K_1 = 0,70 \cdot 10^{-6}$ М. Все исследованные нитрозильные комплексы тормозят активность ФДЭцГМФ, что приводит к накоплению цГМФ, являющегося вторичным мессенджером, влияющим на антиагрегационный эффект в живых организмах. Полученные данные позволяют предполагать, что исследованные нитрозильные комплексы железа могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума; фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата; нитрозильные комплексы железа.

Открытие и изучение реакций монооксида азота (NO)-универсального соединения, выполняющего функции посредника в межклеточных взаимодействиях, цитотоксического эффектора иммунологической защиты организма, регулятора нейротрансмиссии, иммунитета, ингибитора агрегации тромбоцитов и их адгезии на стенках кровеносных сосудов и др., позволило прояснить важные аспекты в механизмах возникновения NO-интермедиатов *in vivo* [1]. К числу таких интермедиатов относятся нитрозильные комплексы железа — природные “депо” NO в клетках, образующиеся в реакциях эндогенного NO с активными центрами негемовых [2Fe-2S] белков [2]. Их синтетические модели используются при разработке фундаментальных основ создания нового поколения лекарственных препаратов, применяемых в терапии социально-значимых заболеваний [3]. Надежно установлено, что недостаток производства NO в клетках связан с такими болезнями, как повышенное кровяное давление, атеросклероз и др. [4], что стимулирует интерес исследователей к синтезу и изучению новых соединений-доноров NO, которые могут легко доставлять NO к биологическим мишеням.

Целью настоящей работы является исследование модуляции активности Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭцГМФ) под влиянием новых доноров монооксида азота (NO) — нитрозильных комплексов железа (нкж) различных структурных типов. Полученные результаты позволяют прогнозировать механизмы действия данного класса хи-

мических соединений как потенциальных лекарственных препаратов.

Известно, что Ca^{2+} -АТФаза СР влияет на молекулярные механизмы транспорта Ca^{2+} [5] и участвует в регуляции баланса ионов Ca^{2+} в клетках. Нарушение баланса ионов Ca^{2+} в клетках влияет на образование тромбов и адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров, предотвращая рост метастазов [6 – 9].

ФДЭцГМФ гидролизует цГМФ, являющийся вторичным мессенджером, влияющим на антиагрегационный эффект в живых организмах [10 – 12].

Экспериментальная часть

В работе использовались альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидаза (яд кобры), АТФ, гистидин производства фирмы “Sigma”; диметилсульфоксид (ДМСО), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трихлоруксусная кислота (ТХУ), сахароза, соли $MgCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCl_2$, Na оксалат, молибдат аммония ($MoNH_4$) фирмы “Реахим”, Россия, после соответствующей дополнительной очистки.

Синтез нитрозильных комплексов железа состава $[Fe_2(SC_6H_6N)_2(NO)_4]$ с 2-аминиофенолином (1); $[Fe_2(SC_6H_6N)_2(NO)_4]$ с 4-аминиофенолином (2); $[Fe(SC(NH_2)_2(NO)_2)_2][Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]$ с тиомочевинной и тиосульфатом (3) выполнен по методикам [3]. Соединения $[Fe_2(SC_3H_3N_2O_2)_2(NO)_4]$ с 5-нитро-2-меркаптопиридинилом (4) и $[Fe_2(SC_7H_5N_4)_2(NO)_4]$ с 1-фенил-1Н-5-меркаптотетразолилом (5) получены по методу [13]; соеди-

нение $N_2H_5[Fe(SC_5H_3N_2O_2)_2(NO)_2]$ с 5-нитро-2- меркаптопиридином (**6**) — по методу [14].

При исследовании соединения **1–6** растворяли в ДМСО и добавляли в объеме 100 мкл на 5 мл реакционной среды. Гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы СР исследовали после 3 мин инкубации препарата с ферментом.

Фермент Ca^{2+} -АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов, как описано в [15].

Активность фермента определяли по методу [15]. Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона кинетической кривой гидролиза АТФ. Удельная активность Ca^{2+} -АТФазы составляла $15000 \text{ нМ} \cdot \text{Рн/мг/мин}$. О скорости изменения концентрации ионов Ca^{2+} судили по кинетике их поглощения везикулами СР.

Ингибирование гидролитической активности ферментов рассчитывали по формуле $I = 100(A_0 - A)/A_0$, где I — относительная активность; A_0 — удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе; A — удельное содержание неорганического фосфора в опытной пробе (в присутствии комплекса).

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [16].

Кинетику ингибирования Ca^{2+} -АТФазы СР исследовали по зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата АТФ в присутствии и отсутствие исследованного соединения **3** в концентрации 2 мкМ [17].

Обратимость действия соединения **3** определяли путём диализа раствора Ca^{2+} -АТФазы СР, содержащего 2 мкМ соединения, растворённого в воде. Диализ прово-

Т а б л и ц а 1

Влияние нитрозильных комплексов железа с органическими лигандами на активность Ca^{2+} -АТФазы СР

Соединение	Торможение активного транспорта Ca^{2+} и гидролиза АТФ, % от контроля							
	Концентрация соединений							
	0,1 мМ		0,01 мМ		0,001 мМ		0,0001 мМ	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
1	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	75 ± 8*	57 ± 6	25 ± 3*	9 ± 1	0
2	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	67 ± 7*	70 ± 7	40 ± 4*	20 ± 2	13 ± 1*
3	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	79 ± 7	43 ± 4*	28 ± 2	21 ± 3*
4	100 ± 10	100 ± 10	57 ± 6	24 ± 2*	20 ± 2	16 ± 2	—	—
5	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	55 ± 6	22 ± 2*	36 ± 4	10 ± 1*
6	100 ± 10	100 ± 10	84 ± 8	63 ± 6*	66 ± 6	14 ± 1*	22 ± 2	0*

Примечание: приведены процентные значения 6–9 опытов по торможению Ca^{2+} -АТФазы СР каждым соединением.

* $p < 0,01$ гидролиза АТФ по сравнению с активным транспортом Ca^{2+} в соответствующей концентрации.

Т а б л и ц а 2

Влияние нитрозильных комплексов железа с органическими лигандами на соотношение $[Ca^{2+}]/[АТФ]$

Соединение	Концентрация соединений, М												
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	К	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	Гидролиз АТФ, ед. удельной активности				Активный транспорт Ca^{2+} , ед. удельной активности					Отношение $[Ca^{2+}]/[АТФ]$			
1	0	12,3	6,7	8,1	0	0	5,29	12,3	1,8	0	0	0,8	1,5
2	0	7,4	6,7	9,62	0	0	5,5	14,8	—	0	0	0,8	1,5
3	0	0	5,9	8,15	0	0	4,3	14,8	—	0	0	0,73	1,8
4	0	2,9	3,2	—	0	1,7	4,0	—	—	0	0,6	1,25	—
5	0	0	2,5	3,2	0	0	3,1	4,4	—	0	0	1,3	1,4
6	0	1,28	3,0	3,56	0	0,85	1,77	4,1	—	0	0,66	0,6	1,15

Т а б л и ц а 3

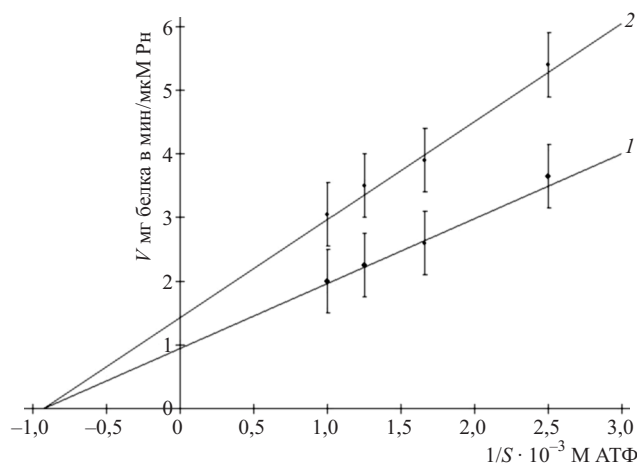
Влияние нитрозильного комплекса железа (3**) на гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФ СР до и после диализа**

Соединение	Активность Ca^{2+} -АТФазы СР, % от контроля			
	До диализа		После диализа	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
3	70 ± 7	45 ± 4	20 ± 2	0*

Примечание: в диализуемые пробы добавляли 2 мкМ соединения **3**.

Приведены процентные значения 4 опытов по торможению активности Ca^{2+} -АТФазы СР с препаратом **3** ($M \pm m$) %.

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем — не содержащим соединений пробам.



Изменение скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата под влиянием соединения 3 в координатах Лайнуивера — Берка: 1 — контроль; 2 — в присутствии соединения 3 в концентрации 2 мкМ.

дили в отношении 100-кратного избытка среды инкубации в отсутствие комплекса в течение 24 ч при 4–5 °С.

Фермент ФДЭЦГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии “Вистар”, как описано в [18]. Активность ФДЭЦГМФ в присутствии и отсутствие химического соединения определяли по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, которое равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении нуклеотидазы [18].

Измерение проводили спектроскопическим методом при длине волны $\lambda = 735$ нм [19], с помощью спектрофотометра “Specord M-40”. Данные обрабатывали статистически по методу [20].

Электрохимическое определение NO осуществляли с помощью сенсорного электрода amINO-2000 системы inNO Nitric Oxide Measuring System (Innovative Instruments, Inc.). Количество NO, генерированное исследуемыми комплексами, фиксировали в течение ~500 с (с шагом 0,2 с) в 1 % водном растворе ДМСО. Навеску $4 \cdot 10^{-6}$ моль растворяли в 10 мл ДМСО, отбирали 1 мл раствора и помещали в электрохимическую ячейку с сенсорным электродом в 49 мл дистиллированной воды. Для калибровки электрохимического сенсора использовали

Таблица 4
Влияние нитрозильных комплексов железа с органическими лигандами на активность ФДЭЦГМФ

Соединение	Торможение активности ФДЭЦГМФ, % от контроля		
	Концентрация соединений		
	0,1 мМ	0,01 мМ	0,001 мМ
1	75 ± 7*	20 ± 2*	5 ± 0,5
2	86 ± 8*	33 ± 3*	0
3	99 ± 10*	70 ± 7*	10 ± 1
4	76 ± 7*	23 ± 2*	16 ± 2
5	78 ± 7*	70 ± 7*	25 ± 3*
6	47 ± 5*	28 ± 3*	9 ± 1

Примечание: приведены процентные значения 6–9 опытов по торможению активности ФДЭЦГМФ с каждым препаратом ($M \pm m$) %.

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем — не содержащим соединений пробам. В качестве контроля принимали 100 % активность фермента без добавления изучаемого химического соединения.

стандартный водный раствор NaNO_2 (100 мкмоль), который добавляли в смесь 0,12 М KI и 1 М H_2SO_4 в 20 мл воды. Все эксперименты проводили в аэробных растворах в термостатированной ячейке при 25 °С и pH 7,0 (pH растворов измеряли с помощью мембранного pH-метра HI 8314 (HANNA instruments)).

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, все исследованные соединения 1–6 полностью тормозят гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы СР в 0,1 мМ концентрации. Соединения 3 и 5 осуществляют 100 % торможение обеих функций Ca^{2+} -АТФазы СР также в 0,01 мМ концентрации. Соединения 1 и 2 тормозят в концентрации 0,01 мМ гидролиз АТФ на (75 ± 8) % и (67 ± 7) % соответственно, при 100 % торможении активного транспорта ионов Ca^{2+} через мембрану СР. Кроме того, соединения 4 и 6 ингибируют в 0,01 мМ концентрации гидролиз АТФ на (63 ± 6) % и (24 ± 2) %, а активный транспорт ионов Ca^{2+} на (84 ± 8) % и (57 ± 6) % соответственно. Практически все исследуемые соединения в концентрациях 0,01–0,001 мМ разобщают транспортную и гидролитическую функции фермента (табл. 1). В концентрации 0,0001 мМ наиболее активными ингибиторами остаются соединения 2, 3, 5 и 6, тормозящие активность фермента на 10–36 %.

Наблюдаемое разобщение гидролиза АТФ и активного транспорта ионов Ca^{2+} при действии исследуемых соединений показывает, что при гидролизе 1 молекулы АТФ в везикулы СР переносится меньшее количество ионов кальция (табл. 2), чем в контроле (АТФ:Са = 1:1,8 соответственно). При этом возникает изменение соотношения вне- и внутриклеточного ионов кальция, что безусловно нарушает агрегацию тромбоцитов, их связь с метаболическими клетками опухоли и предотвращает адгезию последних к стенкам сосудов [21–23].

Нами исследован механизм действия комплекса 3, одного из активных модуляторов активности Ca^{2+} -АТФазы СР.

Действие данного комплекса 3 как ингибитора активности Ca^{2+} -АТФазы СР изучалось на основании анализа зависимости обратных величин скорости ферментативной реакции ($1/V$) от концентрации субстрата ($1/S$) в присутствии исследуемого ингибитора.

Используя численные значения максимальных скоростей гидролиза АТФ под влиянием ингибитора, рассчитывали константу ингибирования K_i , определяющую ха-

Таблица 5
Количество NO, образующееся при разложении нитрозильных комплексов железа (1–6)

Соединение	NO, нМ
1	16,0
2	5,0
3	25,0
4	7,0
5	6,4
6	30,0

Примечание: измерения проводились в 1 % водных растворах ДМСО, $T = 25$ °С, pH 7, условия анаэробные.

ракет взаимодействия исследуемого соединения с ферментом. Расчёт K_i проводили по значениям тангенса угла наклона прямых в координатах Лайнуивера – Берка (рисунок), которые при ингибировании в $1 + [I]/K_i$ раз больше по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора [24].

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что торможение комплексом **3** функции Ca^{2+} -АТФазы носит неконкурентный характер с $K_i = 0,7 \cdot 10^{-6}$ М. Это указывает на отсутствие непосредственного взаимодействия соединения **3** с активным центром фермента [17].

Важно было также выявить обратимость действия соединения **3** на фермент. Анализ данных табл. 3 показывает, что после диализа ингибиторная активность комплекса **3** восстанавливается до (80 ± 2) % от исходной, что указывает на обратимый характер ингибирования функции Ca^{2+} -АТФазы СР исследуемым соединением, а также на наличие нековалентной связи комплекса с ферментом.

Наблюдаемое разобщение гидролитической и транспортной функции фермента, как мы полагаем, связано с конформационными изменениями в структуре мембран СР при действии на неё нитрозильных комплексов железа с органическими лигандами [25, 26].

Как видно из табл. 4, все исследованные нитрозильные комплексы железа с органическими лигандами тормозят активность ФДЭЦГМФ. Так, соединение **2** на (86 ± 8) %, а **3** — на (99 ± 9) % ингибируют активность фермента в 0,1 мМ концентрации (табл. 4). В 0,01 мМ концентрации большую активность проявили соединения **3** и **5**, на (70 ± 7) % тормозящие функцию ФДЭЦГМФ. Это коррелирует с их высокой NO-донорной активностью в растворе (табл. 5).

Полученные данные позволяют предположить, что нитрозильные комплексы железа с органическими лигандами могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов антимагистатического, а также антиагрегационного спектров действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. J. Ignarro (ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego (2000).
2. R. Butler, I. L. Megson, *Chem. Rev.*, **102**(4), 1155 – 1166 (2002).
3. Н. А. Санина, С. М. Алдошин, *Изв. АН, Сер. хим.*, **7**, 1199 – 1227 (2011).

4. S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti, *Med. Res. Rev.*, **27**(3), 317 – 352 (2007).
5. Н. П. Коновалова, *Технол. живых систем*, **1**(3), 42 – 48 (2004).
6. В. П. Нифонтов, Л. В. Татьянаенко, Н. М. Чернов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(5), 522 – 526 (1988).
7. Л. В. Татьянаенко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов и др., *Ж. биомед. химии*, **52**(1), 2 – 6, (2006).
8. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *News Lett.*, **4**(2), 3 – 6 (1997).
9. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, *Neoplasma*, **44**(6), 361 – 365 (1997).
10. F. Rind, *Modern Drug Discoveri*, Nov / Dec, 31, 511 (1998).
11. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Изв. АН., Сер. хим.*, **8**, 1268 – 1323 (2002).
12. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вузовская книга, Москва (2004), с. 360.
13. Г. И. Козуб, Н. А. Санина, Т. А. Кондратьева и др., *Координац. химия*, **38**(8), 553 – 556, (2012).
14. Н. А. Санина, Г. И. Козуб, Т. А. Кондратьева, С. М. Алдошин, *Заявка на изобрет.*, Россия, № 2011142254 от 20.10.2011.
15. В. Б. Ритов, В. М. Мельгунов, П. Г. Комаров, *Докл. АН СССР*, **233**, 730 – 733 (1977).
16. Д. Бейли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1980), с. 50 – 53.
17. И. В. Березин, А. А. Клёсов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, Из-во МГУ, Москва (1973), сс. 77 – 84.
18. Р. Е. Либензон, Т. Т. Щеколдина, О. Е. Ватолкина, *Вопросы мед. химии*, **4**, 526 – 530 (1977).
19. A. Adam, J. Boulanger, M. Azzouzi, *Clin. Chem.*, **30**, 1724 – 1725 (1984).
20. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963), сс. 83 – 90.
21. F. Fidler, *Cancer Res.*, **50**, 6130 – 6138 (1990).
22. K. Honn, J. Onoda, C. Diglio, B. Sloane, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **174**, 16 – 17 (1983).
23. G. A. Schmark, A. M. Levfer, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 177 – 178 (1982).
24. А. Ленингер, *Биохимия*, Мир, Москва (1974).
25. Л. В. Татьянаенко, Р. А. Котельникова и др., *Молек. биол.*, **16**, 6 – 15 (1982).
26. Л. В. Татьянаенко, Р. А. Котельникова, Ю. Ш. Мошковский, *Биофизика*, **32**, 3 – 10 (1982).

Поступила 07.06.13

EFFECT OF IRON NITROSYL COMPLEXES – NO DONORS – ON THE ACTIVITY OF Ca^{2+} -ATPase OF SARCOPLASMIC RETICULUM AND PHOSPHODIESTERASE OF CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE

L. V. Tat'yanyenko, O. V. Dobrokhotova¹, A. I. Kotel'nikov*, N. A. Sanina, G. I. Kozub, T. A. Kondrat'eva, and S. M. Aldoshin

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

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

We have studied the influence of iron nitrosyl complexes – NO donors – of various structural types on the activity of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) phosphodiesterase (PDE). It is established that iron nitrosyl complexes with organic ligands modulate functions of both enzymes. In particular, these complexes effectively inhibit the hydrolytic and transport functions of SR- Ca^{2+} -ATPase (at concentrations within 0.1 – 0.001 mM) and separate the ATP hydrolysis and Ca^{2+} ion transport (at concentrations within 0.01 – 0.0001 mM) thus violating the balance of Ca^{2+} ions in cells, which influences the thrombogenesis and the adhesion of metastatic cells to capillary endothelium. Compound $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2]_2$ $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ produces incompetent reversible inhibition of SR- Ca^{2+} -ATPase function at $K_i = 0.70 \times 10^{-6}$ М. All iron nitrosyl complexes studied inhibit the activity of cGMP-PDE, which leads to the accumulation of cGMP that is a secondary messenger influencing the antiaggregation effect in living organism. The obtained results suggest that the iron nitrosyl complexes studied can be considered as potential drugs.

Keywords: Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum; phosphodiesterase of cyclic guanosine monophosphate; iron nitrosyl complexes