

УДК 577. 151. 04. 577. 152. 313

©Коллектив авторов

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСАМИ (PtIV) и (PdII). КОРРЕЛЯЦИЯ ЭТОГО ПРОЦЕССА С АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ

***Л.В. Татьянаенко, Н.П. Коновалова, Г.Н. Богданов,
О.В. Доброхотова, Б.С. Федоров***

Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка,
Московская область, Ногинский район, проспект им. Н.Н. Семенова, 14;
факс (495) 8–251-54-20.

Новые металлокомплексы платины и палладия на основе замещенных пиридинкарбоновых кислот тормозят активный транспорт ионов кальция и гидролиз АТР мембраносвязанной Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимой АТРазой саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТРаза СР).

Степень активного транспорта ионов кальция во внутриклеточные образования (везикулы саркоплазматического ретикулума) коррелирует с ингибированием образования метастазов экспериментальной меланомы В16.

Мы полагаем, что в механизме торможения метастазирования новыми металлокомплексами платины и палладия пиридинкарбоновых кислот ведущая роль принадлежит изменению нормального соотношения вне- и внутриклеточного содержания ионов кальция. При этом происходит нарушение агрегации тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками опухоли и предотвращение адгезии последних к стенкам сосудов.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТРаза, саркоплазматический ретикулум, никотинамиды, изоникотинамиды, металлокомплексы, антиметастатическая активность.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что патогенез метастазирования включает в себя ряд последовательных процессов, включая и образование тромбов с последующей адгезией метастазирующих клеток к эндотелию капилляров [1]. Для осуществления этого процесса необходимо определенное соотношение вне- и внутриклеточных ионов кальция [2-4]. Энергозависимые кальциевые каналы осуществляют перенос ионов кальция из клеток против концентрационного градиента за счет энергии гидролиза АТР, катализируемого Ca^{2+} -АТРазой. Этот фермент также участвует в активном переносе ионов кальция из клеток в везикулы саркоплазматического ретикулума (СР).

При воздействии на фермент металлокомплексов Pt(IV) и Pd(II) на основе замещенных пиридинкарбоновых кислот, ингибирующих активный транспорт ионов кальция через мембраны СР, происходит изменение нормального соотношения вне- и внутриклеточных ионов кальция, нарушение агрегации тромбоцитов, с последующим их связыванием с метастазирующими клетками. Вероятно, этот процесс предотвращает образование метастазов и является одним из механизмов антиметастатического действия данных соединений.

Целью настоящего исследования является изучение влияния металлокомплексов платины и палладия пиридинкарбоновых кислот на скорость

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

ферментативного гидролиза АТР и трансмембранный перенос ионов кальция, а также сопоставление полученных результатов с антималярийным действием металлокомплексов элементов платиновой группы.

МЕТОДИКА. Ca^{2+} -АТФазу выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов [5, 6]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (на 100 гр. мышц - 0,5 л раствора) и 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 20 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 6 слоев марли и центрифугировали при 36000 g 60 мин. Осадок суспендировали в среде, содержащей 0,6 М KCl и 10 мМ гистидин при pH 7,0-7,2, а затем измельчали в гомогенизаторе Поттера. К полученному гомогенату добавляли альбумин человека и инкубировали при постоянном перемешивании в холодильнике 8–10 часов. Затем гомогенат центрифугировали при 40000 g в течение 90 минут. Из центрифужных пробирок отбирали средний желеобразный слой, который суспендировали в среде, содержащей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30% сахарозе, pH 7,0. Полученный таким образом гомогенат замораживали в жидком азоте и использовали в качестве фермента. Удельная активность Ca^{2+} -АТФазы составляла 15000 нмоль Pi/мин на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по модифицированной методике Лоури [7]. Активность Ca^{2+} -АТФазы измеряли по методу [6]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазол, 100 мМ NaCl, 5 мМ оксалат Na, 0,04 мг белка, 3 мМ АТР, pH 7,2. Реакцию индуцировали добавлением 0,1 мМ CaCl_2 . Активность Ca^{2+} -АТФазы определяли по кинетике изменения pH среды, так как в результате указанной реакции соотношение протонов и фосфат-ионов составляет 1:1. Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона кинетической кривой гидролиза АТР. О скорости изменения концентрации ионов Ca^{2+} судили по времени их полного поглощения везикулами CP, что приводит к прекращению реакции гидролиза АТР.

Относительную активность фермента 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 фосфата в опытной пробе, содержащей химическое соединение (ХС).

Характер ингибирования металлокомплексами Ca^{2+} -АТФазы CP определяли по методу [8]. Исследованные в работе соединения были синтезированы в Институте проблем химической физики РАН (доктором химических наук Б.С. Фёдоровым). При этом исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТР) в отсутствие и присутствии исследуемого металлокомплекса в концентрациях 10^{-5} и 5×10^{-6} М.

Обратимость действия ХС определяли путем диализа растворов Ca^{2+} -АТФазы, содержащих 10^{-4} М исследуемого вещества в ДМСО. Диализ проводили против 100-кратного избытка буфера (10 мМ гистидин, 0,1 мМ ЭДТА в 30% сахарозе, pH 7,0) с добавлением ДМСО при 4°C в отсутствие исследуемых ХС.

Меланому В16 трансплантировали мышам-гибридам BDF₁ (весом 22-24 г) под кожу бока. Трансплантант содержал 5×10^6 опухолевых клеток. Оценку эффекта проводили на 28 сутки после трансплантации. Критерием эффективности терапии служил индекс ингибирования метастазов (ИИМ), учитывающий частоту и интенсивность метастазирования.

$$\text{ИИМ}\% = \frac{(A_k \times B_k) - (A \times B)}{A_k \times B_k} \times 100,$$

где A_k – частота метастазирования в контрольной группе; A – частота метастазирования в опытной группе; B_k – среднее число метастазов в контрольной группе; B – среднее число метастазов в опытной группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее было показано, что препарат АК–2123, относящийся к классу нитротриазолов, в концентрациях, соответствующих терапевтическим дозам, ингибирует активный транспорт ионов кальция в цистерны СР Са²⁺-АТразой [9-12]. Нами впервые было высказано предположение, что антиметастатический эффект АК–2123 обусловлен ингибированием активного транспорта ионов кальция через биологические мембраны [11-13].

В настоящей работе проведены исследования действия платиновых и палладиевых металлокомплексов, проявляющих значительный антиметастатический эффект, на активный транспорт ионов кальция и гидролиз АТР Са²⁺-АТразой СР. Результаты исследования действия ХС на гидролитическую и транспортную функции Са²⁺-АТразой СР представлены в таблице 1. Как видно из представленных данных, металлокомплексы Pt(IV) и Pd(II) производных никотиновой и изоникотиновой кислот тормозят активный транспорт ионов кальция через мембрану СР. При этом наблюдается разобщение гидролитической и транспортной функций фермента. Теоретически соотношение Са²⁺/АТР (удельных скоростей транспорта кальция и удельной активности гидролиза АТР) равно 2, что соответствует переносу двух ионов Са²⁺ при гидролизе одной молекулы АТР. Под влиянием всех изученных ХС наблюдается торможение этих ферментативных процессов. Ингибирующее действие металлокомплексов на активный транспорт ионов кальция по мере своего усиления сопровождается снижением соотношения Са²⁺/АТР. Качественное соответствие между этими показателями позволило графически проанализировать взаимосвязь соотношения Са²⁺/АТР с антиметастатическим действием металлокомплексов элементов платиновой группы, как это показано на рисунке 1.

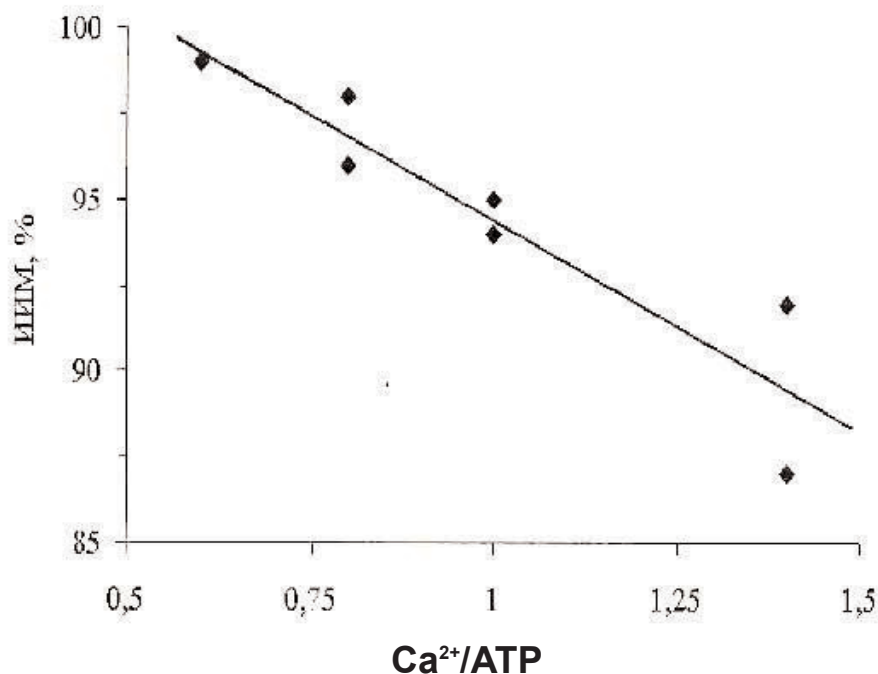


Рисунок 1.

Зависимость антиметастатической эффективности металлокомплексов Pt(IV) и Pd(II) от степени ингибирования активного транспорта ионов кальция.

По оси ординат – торможение активного транспорта ионов кальция через мембраны СР (в % от контроля) исследуемыми металлокомплексами (в 0,1 мМ концентрации).

По оси абсцисс – торможение роста метастазов меланомы В16 (ИИМ%).

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Таблица 1. Влияние металлокомплексов Pt(IV) и Pd(II) на основе замещенных пиридинкарбоновых кислот на активный транспорт ионов кальция через мембраны СР, гидролиз АТР Ca^{2+} -АТРазой СР и на ингибирование экспериментальных метастазов меланомы В16.

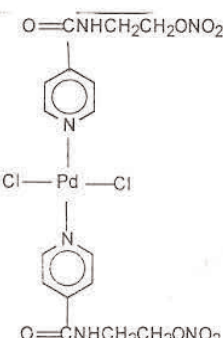
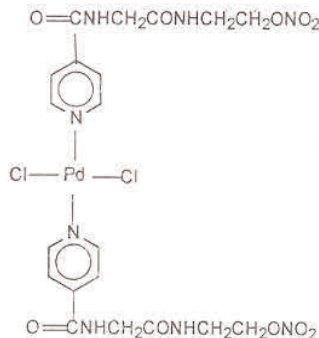
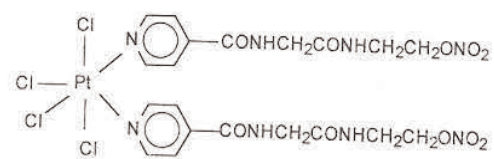
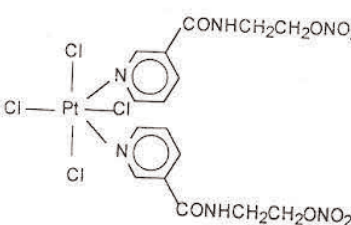
№	Формулы новых ХС	ИИМ% *	Торможение активного транспорта $\pm \text{Ca}^{2+}$, %%	Торможение гидролиза АТР, %%	Ca^{2+} / АТР
1	2	3	4	5	6
1		70	70±7	40±4	1,6
2		87	77±8	84±8	1,4
3		92	75±8	73±7	1,4
4		94	78±4	81±8	1

Таблица 1. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
5		95	80±8	78±6	1
6		96	83±7	82±8	0,8
7		98	85±8	87±8	0,8
8		99	99±9	94±9	0,6

Примечание: Ca^{2+} -АТРаза СР – Ca^{2+} -активируемая, Mg^{2+} -зависимая АТРаза саркоплазматического ретикулума. Здесь и в таблице 2 даны средние \pm ошибка 3 - 4 опытов.

На рисунке 1 представлена линейная корреляция между степенью торможения образования экспериментальных метастазов меланомы В16 и ингибированием активного транспорта ионов кальция исследуемыми ХС.

Палладиевые комплексы изоникотиновой кислоты менее активны как ингибиторы роста метастазов экспериментальной опухоли В16 по сравнению с платиновыми комплексами, что, вероятно, связано с их выраженной гидрофильностью.

Наблюдаемое разобщение гидролитической и транспортной функций Ca^{2+} -АТРаза возможно объясняется конформационными изменениями в структуре мембраны СР при действии на нее исследуемых ХС, что приводит к нарушению транспорта ионов кальция через мембрану СР [13, 14].

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Данные, представленные на рисунке 2, показывают, что торможение одним из комплексов (№4, табл.1) активности Ca^{2+} -АТразы СР носит конкурентный характер с $K_i = 3 \times 10^{-6}$ М. Это указывает на связывание соединения с активным центром фермента [8].

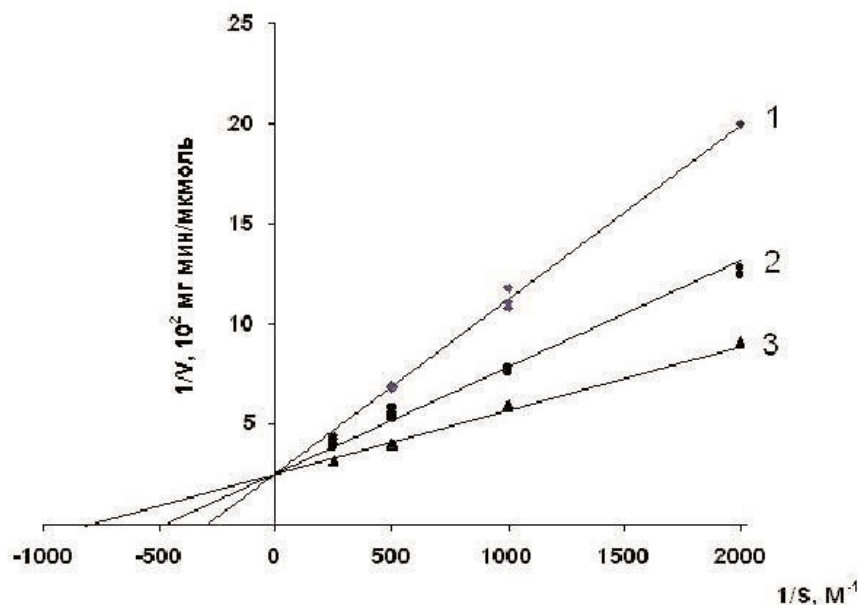


Рисунок 2.

Исследование характера действия (в координатах Лайнуивера-Берка) соединения ИНК-2 на функцию Ca^{2+} -АТразы саркоплазматического ретикулула. 1 - в отсутствии ХС, 2 - в присутствии ИНК-2 в концентрации 10^{-5} М, 3 - в присутствии ИНК-2 в концентрации 5×10^{-5} М.

Данные таблицы 2 показывают, что после диализа ингибирующая активность платинового металлокомплекса №4 снижается до 23%, а палладиевого №1 - до 0. Различия в обратимости торможения согласуются с различиями в активности данных соединений на рост метастазов меланомы В16. Так, индекс ингибирования в случае препарата №4 составляет 95%, а №1 - 70% (см. табл. 1).

Таблица 2. Обратимость действия ХС на функцию Ca^{2+} -АТразы СР.

Формулы соединений	Ингибирование активного транспорта ионов кальция Ca^{2+} -АТразой СР (в % от контроля)	
	До диализа	После диализа
	80±8	23±3
	70±7	0

Таким образом, представленные в работе данные, свидетельствуют о выраженном торможении активного транспорта ионов Ca^{2+} и гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой СР исследуемыми металлокомплексами платины и палладия производных пиридинкарбоновых кислот. При этом торможение активного транспорта ионов кальция коррелирует со степенью ингибирования роста экспериментальных метастазов меланомы В16

Наблюдаемое разобщение гидролиза АТФ и активного транспорта ионов кальция при действии исследуемых ХС показывает, что при гидролизе одной молекулы АТФ в везикулы СР переносится меньшее количество ионов кальция, чем в норме. Возникающее при этом изменение соотношения вне- и внутриклеточного кальция безусловно вызывает нарушение агрегации тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками опухоли и, в конечном итоге, приводит к предотвращению адгезии последних к стенкам сосудов.

Полученные нами данные показывают, что одним из возможных механизмов торможения роста экспериментальных метастазов меланомы В16 исследованными металлокомплексами является ингибирование активного транспорта ионов кальция через биологические мембраны.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Fidler J.* (1990) *Cancer Res.*, **50**, 6130–6138.
2. *Нифонтов В.П., Татьянаенко Л.В., Чернов В.А., Соколова Н. М.* (1988) *Хим. – фарм. журн.*, **№5**, 522–526.
3. *K., Honn Onoda J., Diglio C., Sloane B.* (1983) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **174**, 16–17.
4. *Schmunk G.A., Levfer A.M.* (1982) *Res. Communic. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 178–187.
5. *Ритов В.Б.* (1977) *Итоги науки и техники. Биологическая химия*, **111**, 1–80.
6. *Ритов В.Б., Мельгунов В.М., Комаров П.Г.* (1977) *Докл. АН СССР*, **233**, 730–733.
7. *Бейли Д.* (1980) *Методы химии белков*, Мир, М
8. *Березин И.В., Клесов А.А.* (1973) *Практический курс химической и ферментативной кинетики*. Изд – во. МГУ, с. 77 – 84.
9. *Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Татьянаенко Л.В.* (1997) *Вопросы онкологии*, **43**, 309–312.
10. *Konovalova N.P., Volkova L.M., Tatyanyenko L.V.* (1997) *News Letter*, **4**(2), 3–6.
11. *Konovalova N.P., Volkova L.M., Tatyanyenko L.V.* (1997) *Neoplasma*, **44**(6), 361–365.
12. *Konovalova N.P., Volkova L.M., Tatyanyenko L.V.* (1997) *The Europ. Cancer Conference Hamburg. – Abstracts*.
13. *Татьяненко Л.В., Котельникова Р.А.* (1982) *Мол. биол.*, **16**, 6–15.
14. *Татьяненко Л.В., Котельникова Р.А., Мошковский Ю.Ш.* (1982) *Биофизика*, **32**, 3–10.

Поступила: 04. 10. 2004.

INHIBITION OF ACTIVE TRANSPORT OF CALCIUM IONS BY PT(IV) AND PD(II)
METAL COMPLEXES. CORRELATION BETWEEN THE PROCESS AND THE INHIBITION
OF GROWTH OF EXPERIMENTAL METASTASES

L.V. Tatyanyenko, N.P. Konovalova, G.N. Bogdanov, O.V. Dobrokhotova, B.S. Fedorov

Institute of Problems of Chemical Physics, RAS, 5, N.Semenova pr., 1, Chernogolovka,
Moscow region, 142432 Russia; fax: (495) 8-251-54-20

Newly synthesized compounds, namely, platinum and palladium metal complexes based on substituted pyridinecarboxylic acids inhibit both active transport of Ca ions and hydrolysis of ATP, catalyzed by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

The degree of active transport of Ca ions to vesicles correlated to the inhibition of metastases of experimental melanoma B16 by compounds studied.

We suggest that the mechanism responsible for inhibition of metastases by newly synthesized compounds consists in change of normal ratio of extra- and intracellular content of Ca^{2+} ions that influences platelet aggregation, required for adhesion of metastasizing tumor cells to vascular walls.

Key words: Ca^{2+} -ATPase, sarcoplasmic reticulum, nicotinamides, isonicotinamides, metal complexes, antimetastatic activity.