

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 577.151.04; 577. 152. 313

© Коллектив авторов

### МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФOSФАТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ Pt (IV) НА ИХ ОСНОВЕ

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

Институт проблем химической физики РАН. 142432, г. Черноголовка, Московской области, Ногинского района, пр. Н.Н.Семенова 1; факс: (495) 82515420; эл. почта: mdv@icp.ac.ru

Исследовано влияние замещенных никотин- и изоникотинамидов, а также металлокомплексов Pt (IV) на их основе, на активность фосфодиэстеразы циклического аденозинмонофосфата (ФДЭ-сАМР), являющегося вторичным мессенджером метаболизма. Установлено, что производные изоникотинамида являются эффективными активаторами фермента. Напротив, замещенные никотинамиды ингибируют ферментативную активность ФДЭ-сАМР, так же эффективно, как и препарат сравнения теofilлин. Ингибирующее действие никотинамидов и металлокомплексов на их основе в целом не различается между собой. Один из металлокомплексов этого ряда, в отличие от соответствующего лиганда, ингибирует фермент по конкурентному типу, хотя по обратимости действия комплекс и лиганд были одинаковы.

**Ключевые слова:** фосфодиэстераза-сАМР, активация, ингибирование, никотинамиды, изоникотинамиды, металлокомплексы Pt (IV).

**ВВЕДЕНИЕ.** Физиологически активные металлокомплексы элементов платиновой группы привлекают неослабевающее внимание в свете поисков и создания новых лекарственных средств противоопухолевого и антиметастатического действия.

Одно из перспективных направлений проводимых нами работ включает синтез и изучение свойств металлокомплексов Pt(IV) на основе метаболически активных лигандов, в качестве которых выступают нитроксиалкиламидные производные пиридинкарбонновых кислот [1].

Поскольку находящиеся в структуре нитроксиэтильные группировки не являются комплексообразующими, то правомерен вопрос о наличии биологической активности у лигандов и сопоставлении ее с действием соответствующих металлокомплексов на изолированные ферменты. Именно такую цель преследует данная работа, где на ферментной системе гидролиза сАМР изучали и количественно оценивали влияние новых металлокомплексных соединений платины и соответствующих им лигандов:



Этот процесс основан на использовании ФДЭ-сАМР, осуществляющей гидролитическое расщепление одного из важнейших вторичных мессенжеров метаболизма - сАМР, который является аллостерическим эффектором сАМР-зависимых протеинкиназ, опосредующим кроме того действие многих гормонов и нейромедиаторов.

Фосфодиэстераза сАМР принадлежит к категории растворимых ферментов, каждый из которых представлен семейством нескольких изоформ. Фосфодиэстеразы являются единственным классом ферментов, катализирующих во всех типах клеток и тканей распад циклических нуклеотидов, в частности, сАМР, который, активируя важнейшие протеинкиназы, участвует в регуляции многих метаболических процессов и основополагающих клеточных функций. ФДЭ-сАМР подвержена влиянию достаточно широкого спектра соединений. Воздействуя на фосфодиэстеразу различными препаратами, можно изменять в клетках уровень сАМР. Поэтому фосфодиэстераза может служить моделью, с помощью которой отбираются вещества, используемые для воздействия на уровень сАМР в клетках, и, в перспективе, для использования этих соединений в качестве лекарственных препаратов. В модельных экспериментах необходимы, как правило, значительно большие концентрации как фосфодиэстеразы, так и испытуемых соединений, чем те, которые вызывают соответствующий эффект в клетках. Было показано [2], что отобранные в модельных экспериментах ингибиторы ФДЭ-сАМР в опытах *in vivo* вызывают в значительно меньших концентрациях ингибирование фермента и соответствующее повышение уровня сАМР, которого оказывалось вполне достаточно для получения максимального физиологического эффекта.

Ряд ингибиторов фосфодиэстеразы уже широко применяется в качестве лекарственных препаратов (теофиллин, кофеин, теобромин и т. д.)

Ингибиторы ФДЭ-сАМР, способствующие повышению уровня сАМР, и активаторы, лимитирующие его содержание, представляют большой интерес как потенциальные лекарственные препараты. Например, среди ингибиторов ФДЭ-сАМР, изученных в клинической практике, найдены противовоспалительные агенты и средства лечения астмы [3] и обструктивных лёгочных заболеваний [4].

В ряду активаторов ФДЭ-сАМР выявлены специфические стимуляторы ростовых факторов, в частности, интенсифицирующие пролиферацию лимфоцитов периферической крови [5].

В данной работе приведены результаты по влиянию замещенных амидов пиридинкарбоновых кислот на активность ФДЭ-сАМР препаратов головного мозга крыс.

**МЕТОДИКА.** Препарат ФДЭ-сАМР выделяли из коры головного мозга крыс линии Вистар [6]. Ткань головного мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлажденного 0,2 М трис-буфера, рН 7,55. Гомогенат центрифугировали в течение 1 часа при 40000 g. Супернатант, содержащий ФДЭ-сАМР, замораживали в жидком азоте. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [7]. Активность ФДЭ-сАМР определяли по количеству образующегося в процессе субстрат-сопряжённой ферментативной реакции неорганического фосфата (см. схему) [8]. К 1 мл 0,2 М трис-буфера (рН 7,6) добавляли аликвоту раствора ФДЭ-сАМР, содержащего 1 мг белка. Исследуемые химические соединения (ХС) в концентрациях  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М добавляли в виде растворов в ДМСО. Через 30 мин преинкубации при комнатной температуре, добавляли 0,1 мМ сАМР. Пробы инкубировали в течение 20 мин при 30°C, после чего их помещали на 3 мин. в кипящую водяную баню. Затем в охлажденные до комнатной температуры пробы добавляли 50 мкг яда кобры (содержащего 5'-нуклеотидазу) и инкубировали их при 30°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0,2 мл 55% трихлоруксусной кислоты и реакционную смесь центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. В отделенном супернатанте по реакции с молибдатом аммония при

последующем спектрофотометрировании ("Specord M – 40") определяли удельное содержание неорганического фосфата. 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;

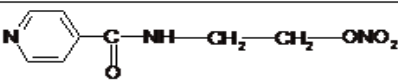
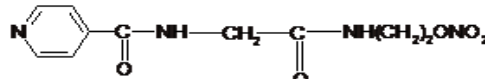
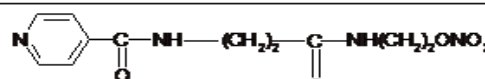
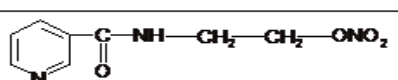
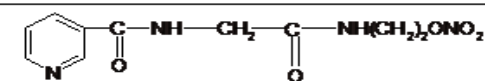
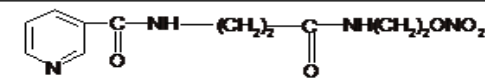
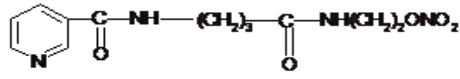
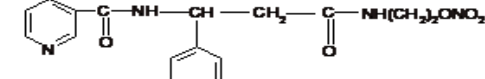
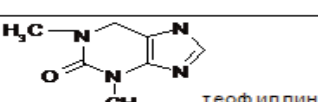
A – удельное содержание неорганического фосфата в опытной пробе.

Для определения характера ингибирования новых ХС исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (сАМР) в отсутствие и присутствии исследуемых ингибиторов функции ФДЭ-сАМР в концентрациях  $10^{-4}$  и  $5 \times 10^{-5}$  М [9].

Обратимость действия ХС определяли путем диализа проб, содержащих ФДЭ-сАМР в отсутствие и присутствии  $10^{-4}$  М ХС в ДМСО. Диализ проводили против 100-кратного избытка 0,2 М трис-буфера с добавлением ДМСО в течение 24 часов при 4-5°C в отсутствие исследуемых ХС.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Все перечисленные здесь эффекты ингибирования и активации ФДЭ-сАМР были получены при изучении одного класса ХС – фосфатидных жирных кислот [10]. Полученные численные значения эффектов действия этого класса ХС приведены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние замещённых амидов пиридинкарбоновых кислот на активность ФДЭ-сАМР.

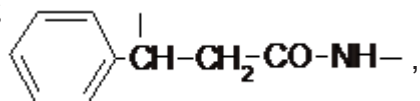
№	Формулы соединений	Изменение активности ФДЭ-сАМР в % от контроля		
		Концентрация ХС		
		$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М	$10^{-6}$ М
1		+ 40±4	+ 30±3	0
2		+ 70±5	+ 50±5	+ 25±4
3		+ 80±10	+ 60±6	+ 30±3
4		- 64±6	- 50±5	- 22±3
5		- 58±6	- 47±5	- 40±4
6		- 47±5	- 37±4	- 35±4
7		- 43±3	- 33±2	- 20±5
8		0	0	0
9	 теофиллин	- 63±8	- 45±5	- 30±3

Примечание: приведены средние ± среднеквадратичные отклонения 3-4 опытов.

## РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ cAMP

Согласно этим данным, все исследованные ХС проявляют модулирующее действие на активность ФДЭ-сАМР. При этом производные изоникотиновой кислоты выступают как активаторы фермента, тогда как производные никотиновой кислоты ингибируют ФДЭ-сАМР. Попарное сопоставление данных, полученных на примерах № 1 и № 4, № 2 и № 5, № 3 и № 6, убедительно свидетельствуют о том, что характер влияния на активность ФДЭ-сАМР определяется положением заместителей в пиридиновом цикле: никотинамиды составляют группу ингибиторов, а изоникотинамиды – активаторов ФДЭ-сАМР.

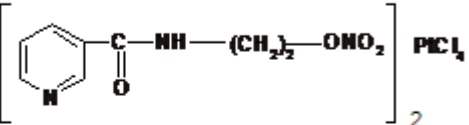
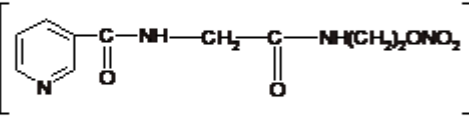
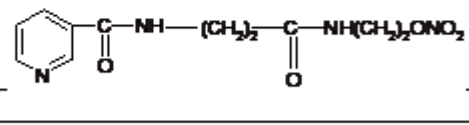
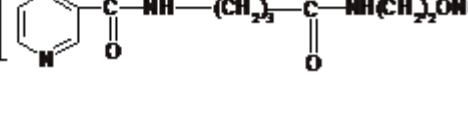
Данные таблицы 1 свидетельствуют о достаточно высокой ингибирующей способности замещенных никотинамидов, большинство которых соответствует по активности препарату сравнения теofilлину, который является классическим ингибитором функции ФДЭ-сАМР. В ряду никотинамидов №№ 4-8 способность к ингибированию ФДЭ-сАМР закономерно снижается по мере увеличения гидрофобных свойств фрагментов заместителей:  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ ;  $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-$ ;  $-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{NH}-$ ;



что сопровождается падением ингибирующей активности до нуля.

Как видно из таблицы 2, ингибирующее действие комплексов Pt (IV) практически не отличается от влияния соответствующих лигандов на функцию ФДЭ-сАМР. Следует отметить, что в целом с увеличением липофильности ХС, а, следовательно, и их мембранотропности происходит снижение их ингибирующего действия на функцию гидрофильной ФДЭ-сАМР.

Таблица 2. Изменение активности ФДЭ-сАМР при действии металлокомплексов Pt(IV).

№	Формулы соединений	Изменение активности ФДЭ-сАМР в % от контроля		
		Концентрация ХС		
		$10^{-4}\text{M}$	$10^{-5}\text{M}$	$10^{-6}\text{M}$
10		-70±7	-58±3	-38±2
11		-70±7	-48±5	-42±4
12		-65±7	-43±4	-27±3
13		-43±5	-28±3	-10±1

Примечание: приведены средние ± среднеквадратичные отклонения 3-4 опытов.

Нетрудно видеть, как и в случае лигандов (табл. 1), платиновые комплексы на их основе, ингибируют активность ФДЭ-сАМР подобно лигандам этих комплексов. При этом по мере увеличения гидрофобности металлокомплексов их ингибирующая активность возрастает.

Ключевым вопросом механизма действия ферментов является исследование обратимости их действия на функцию ФДЭ-сАМР.

Данные таблицы 3 показывают, что после диализа активность фермента восстанавливается практически до уровня контроля, что указывает на нековалентное связывание ингибиторов № 2 и № 10 с активным центром фермента. Эти соединения являются обратимыми ингибиторами функции ФДЭ-сАМР.

Таблица 3. Влияние соединений №2 и № 10 на активность ФДЭ-сАМР до и после диализа.

	Ингибирование активности ФДЭ-сАМР в % от контроля	
	до диализа	после диализа
№2	60±5	10±1
№10	70±7	12±1

Примечание: приведены средние  $\pm$  среднеквадратичные отклонения 3-4 опытов.

На рисунке показано, что ХС № 10 является конкурентным ингибитором ФДЭ-сАМР с  $K_i=4 \times 10^{-6}$  М.

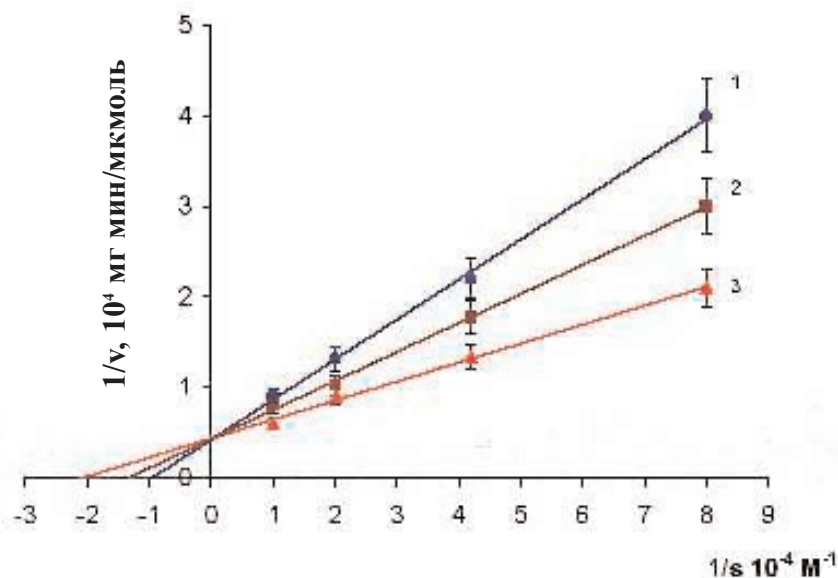


Рисунок.

Зависимость скорости гидролиза сАМР от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

1 - без соединения; 2 - в присутствии 0,05 мМ комплекса № 10;  
3 - в присутствии 0,1 мМ комплекса № 10.

Таким образом, проведенные исследования действия новых металлокомплексов Pt (IV), и производных никотиновой кислоты в качестве лигандов на функцию ФДЭ-сАМР показали, что на активность фермента, практически одинаково влияют платиновые металлокомплексы и соответствующие им лиганды (см. табл. 1 и 2).

## РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ cAMP

Увеличение липофильности исследуемых ХС, а, следовательно, и их мембранотропности приводит к снижению ингибирующего действия новых ХС на функцию ФДЭ-сАМР.

**ВЫВОДЫ.** Платиновый комплекс № 10 (табл. 2) конкурентно тормозит активность ФДЭ-сАМР со значением  $K_i=4 \times 10^{-6}$  М (рис.). Это указывает на взаимодействие химического соединения № 10 с активным центром фермента (ФДЭ-сАМР).

Соединения № 2 и № 10 (табл. 3) являются обратимыми ингибиторами ФДЭ-сАМР, что указывает на нековалентное связывание препаратов с ферментом.

Многие из исследованных ХС (табл. 1 и 2) влияют на активность ФДЭ-сАМР аналогично препарату сравнения теofilлину, способному снижать агрегацию тромбоцитов, и усиливать сократительную деятельность миокарда.

Эти фармакологические эффекты ХС связаны с ингибированием активности ФДЭ-сАМР, приводящим к накоплению в организме одного из важнейших внутриклеточных мессенжеров - сАМР.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Федоров Б.С., Головина Н.И., Аракчеева В.В., Фадеев М.А. (1999) Изв. А. Н., №8, 1604–1606.
2. Schwabe U., Ebert R. (1972) Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol., **274**, 287–298.
3. Yhafner D., German P.G. (2000) Am.J. Respin. Crit. Care. Med., **161**, 1495–1500.
4. Torfy T.J. (2000) Tends Pharmacol. Sci., **21**, 157–159.
5. Flores J., Casaceca T., Martinez A.C. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 10334–10340.
6. Либензон Р.Е., Шеколдина Т.Т., Ватолкина О.С. (1977) Вопр. мед. химии, **23**, 526–530.
7. Бейли Д. (1980) Методы химии белков.-М., Мир.
8. Ratrum W.B., Beltlach M.V. (1969) Analyt. Biochem., **28**, 436–446.
9. Березин И.В., Клесов А.А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики., МГУ, М, с. 77–84.
10. Madelein Pic., Yan Huang, Michel Lagarde (2000) J. Med. Chem., **43**, 1678–1685.

Поступила: 04. 10. 2004

## MODULATION OF REACTIVITY OF CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE UNDER THE EFFECT OF PYRIDINECARBOXYLIC ACID DERIVATIVES AND Pt(IV) METAL COMPLEXES ON THEIR BASIS

*L.V. Tatyanyenko, G.N. Bogdanov, O.V. Dobrokhotova, M.A. Fadeev, B.S. Fedorov*

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

The effect of substituted nicotinamides and isonicotinamides and Pt(IV) metal complexes based on the substituted nicotinamides and isonicotinamides on the activity of cAMP phosphodiesterase was studied. Isonicotinamide derivatives are efficient enzyme activators, whereas substituted nicotine amides are inhibitors of enzymatic cAMP phosphodiesterase activity; their inhibitory potency is comparable to that of theophylline used as a reference drug.

**Key words:** cAMP phosphodiesterase, activation, inhibition, nicotinamides, isonicotinamides, Pt(IV) metal complexes.