

УДК 547.915+547.94+535.37

©Глазев, Нефёдов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА С ТИОФОСФОРНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ АЛКАЛОИДОВ *CHELIDONIUM MAJUS L. IN VITRO*

*А.А. Глазев, Л.И. Нефёдов**

НИЛ биохимии биологически активных веществ Гродненского государственного университета им. Янки Купалы, 230017 Республика Беларусь, Гродно, 52, БЛК,
тел./факс: +375 (152) 48 75 41, тел.: +375 (29) 63 76 982;
эл. почта: l.nefyodov@grsu.by; www.nil.grsu.by

В системе *in vitro* проведены исследования взаимодействия восстановленного глутатиона с тиофосфорными производными алкалоидов *Chelidonium majus L.*

Измерение интенсивности флуоресценции растворов алкалоидов и их производных, инкубируемых с глутатионом *in vitro*, получены на спектрофлуориметре Solar C2203 и на спектрофотометре Aminco-Bowman, при длинах волн – $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 470/597 нм.

Константы ассоциации, количественно характеризующие химическое взаимодействие тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.* с восстановленным глутатионом, определяли с помощью метода тушения флуоресценции.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о возможности непосредственного взаимодействия восстановленного глутатиона с тиофосфорными производными алкалоидов *Chelidonium majus L.*, которое носит сложный, комплексный характер.

Экспериментальные данные позволяют предположить аналогичное взаимодействие тиофосфорных производных алкалоидов чистотела с SH-группами аминокислотных остатков, входящих в состав активных центров ряда ключевых ферментов метаболизма аминокислот и их производных.

Ключевые слова: восстановленный глутатион, тиофосфорные производные алкалоидов, эффект тушения флуоресценции.

ВВЕДЕНИЕ. Установлено, что препарат NSC-631570 на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого обладает избирательным цитостатическим и/или цитотоксическим действием на злокачественные, но не на нормальные клетки [1], а реализация его противоопухолевого действия связана с уменьшением потребления O_2 , угнетением синтеза РНК, ДНК и белка в раковых клетках [2], влиянием на апоптоз (ингибирование топоизомераз I, II и активация эндонуклеаз) [3], что приводит к селективному ингибированию злокачественного роста [4, 5].

Вероятные механизмы противоопухолевого действия алкалоидов изохинолиновой группы *Chelidonium majus L.* и их производных могут быть также обусловлены взаимодействием как нативных алкалоидов, так и их тиофосфорных производных с SH-группами аминокислотных остатков, входящих в состав активных центров ряда ферментов [6, 7].

Подтвердить подобные предположения может взаимодействие этих соединений с естественным внутриклеточным антиоксидантом – восстановленным глутатионом (GSH), имеющим в своем составе свободную сульфгидрильную группу остатка

* - адресат для переписки

цистеина. Такое взаимодействие с восстановленным глутатионом убедительно продемонстрировано для алкалоидов группы β -карболина *in vitro* [8, 9].

С целью выяснения возможности прямого взаимодействия тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus* L. с восстановленным глутатионом и изучения его вероятного механизма, нами проведено исследование взаимодействия указанных соединений *in vitro* с использованием фотометрического метода анализа и метода флуоресцентной спектроскопии.

МЕТОДИКА. Исследования проведены в системе *in vitro*. К приготовленным *ex tempore* растворам восстановленного глутатиона ("Sigma", США) в концентрациях 50, 100 и 200 мкМ добавляли растворы тиофосфорных производных алкалоидов чистотела (препарата NSC-631570 – конъюгат суммы алкалоидов *Chelidonium majus* L. с тиофосфорной кислотой в виде водного раствора в ампуле в концентрации 5 мг в 5 мл ("Nowicky Pharma", Австрия)) в концентрациях 100, 200 и 500 мкг/мл. Полученные образцы инкубировали в термостате 150 минут при 37°C.

Для идентификации и количественного определения не связанного, восстановленного глутатиона, по свободным SH-группам остатков цистеина, использовали водный раствор реактива Элмана (5,5'-дитио-бис[2-нитробензойная кислота]) в концентрации 2 мг/мл, который для дериватизации свободного глутатиона [10, 11] добавляли в объёме 30 мкл к 1 мл каждого исследуемого образца.

Для доказательства корректности использования реактива Элмана были проведены контрольные измерения, которые показали, что исследуемые производные алкалоидов чистотела большого в условиях опыта не взаимодействуют с указанным реактивом.

Измерение оптической плотности растворов восстановленного глутатиона, инкубируемого с тиофосфорными производными алкалоидов чистотела, производили с помощью UV-Vis спектрофотометра CARY 100 Scan Varian.

В качестве стандарта сравнения по оптической плотности использовали пробу с водой (1000 мкл воды+30 мкл реактива Элмана). Концентрацию восстановленного глутатиона определяли спектрофотометрически (по закону Бугера–Ламберта–Бера), по поглощению на длине волны 412 нм, с учетом длины оптического пути (1 см) и коэффициента молярной экстинкции $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Константы ассоциации, количественно характеризующие химическое взаимодействие тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus* L. с восстановленным глутатионом, определяли с помощью метода тушения флуоресценции [12, 13].

Измерение интенсивности флуоресценции растворов алкалоидов и их производных, инкубируемых с глутатионом *in vitro*, производили в кварцевых прямоугольных кюветах с длиной оптического пути 1 см. Объём исследуемых растворов составлял 1,0 мл. Флуоресценцию регистрировали под углом 90° к направлению пучка возбуждающего света, с помощью спектрофлуориметра Solar C2203 и спектрофотофлуориметра Aminco-Bowman, при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}}=470 \text{ нм}$, и длине волны эмиссии $\lambda_{\text{em}}=597 \text{ нм}$.

Расчет значений равновесной константы ассоциации восстановленного глутатиона с алкалоидами по изменению относительной интенсивности флуоресценции исследуемых растворов в зависимости от концентрации тушителя, проводили по уравнению Штерна–Фольмера: $I_0/I = 1 + K_{\text{sv}} [Q]$, где I_0 и I – интенсивности флуоресценции, соответственно, в отсутствии и в присутствии тушителя, а $[Q]$ – концентрация тушителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты измерений концентраций восстановленного глутатиона при добавлении тиофосфорных производных алкалоидов чистотела *in vitro* (табл. 1, рис. 1) демонстрируют значимое уменьшение содержания глутатиона в анализируемых образцах, пропорционально увеличению добавленной концентрации алкалоидов чистотела, входящих в состав препарата NSC-631570.

Таблица 1. Изменения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) при инкубации с различными концентрациями тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.*

№	Условия опыта	C_{GSH} , мкМ (опыт)	C_{GSH} , мкМ (контроль)
1	50 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	23,64±1,33	52,26±2,71
2	50 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	21,36±1,04	52,26±2,71
3	50 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	16,77±1,21	52,26±2,71
4	100 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	62,24±3,48	100,32±5,15
5	100 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	50,60±2,85	100,32±5,15
6	100 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	47,49±2,98	100,32±5,15
7	200 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	105,84±5,05	132,60±6,34
8	200 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	83,35±4,26	132,60±6,34
9	200 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	51,60±2,36	132,60±6,34

Примечание. Здесь и в таблице 2 представлены только статистически достоверно меняющиеся значения исследуемых параметров эксперимента ($p < 0,05$).

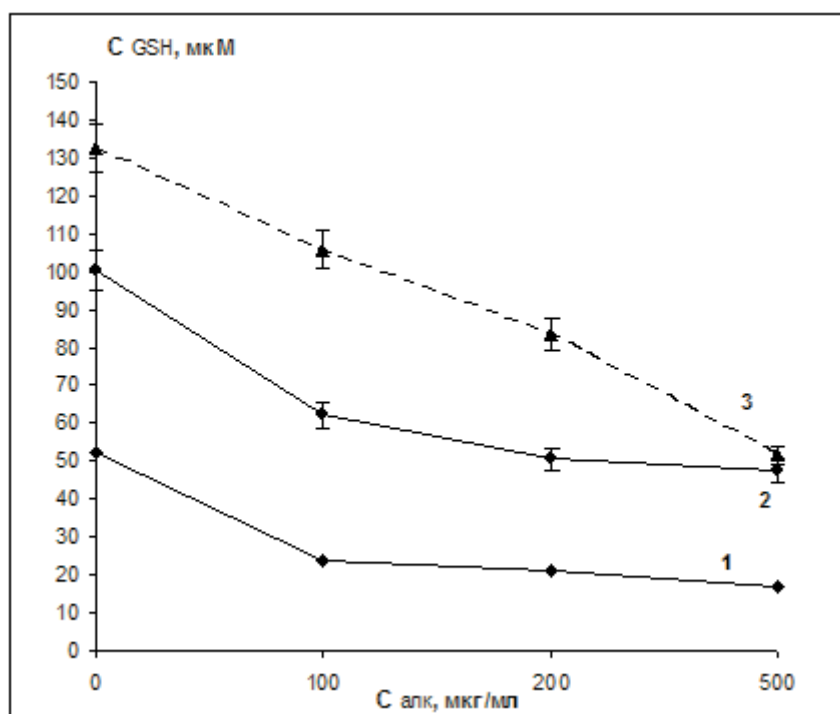


Рисунок 1.

Изменения концентраций восстановленного глутатиона (C_{GSH}) при добавлении тиофосфорных производных алкалоидов чистотела ($C_{алк}$): 1 - 50 мкМ глутатиона, 2 - 100 мкМ глутатиона; 3 - 200 мкМ глутатиона.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНА С ТИОФОСФАТАМИ АЛКАЛОИДОВ

Полученные данные об изменении интенсивности флуоресценции растворов изохинолиновых алкалоидов чистотела (табл. 2) и построенные на их основе графики в координатах Штерна–Фольмера (рис. 2) доказывают наличие эффекта тушения флуоресценции тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus* L. (флуорофор) восстановленным глутатионом (тушитель).

Таблица 2. Значения интенсивности флуоресценции растворов тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus* L. при инкубации с различными концентрациями восстановленного глутатиона.

№	Условия опыта	I (опыт)	I ₀ (контроль)	I ₀ /I
1	50 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	13,00±0,15	14,00±0,20	1,077±0,012
2	100 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	11,50±0,10	14,00±0,20	1,217±0,015
3	200 мкМ GSH + 100 мкг/мл алкалоидов	10,00±0,11	14,00±0,20	1,273±0,014
4	50 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	27,00±0,14	28,50±0,26	1,056±0,015
5	100 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	23,50±0,17	28,50±0,26	1,213±0,016
6	200 мкМ GSH + 200 мкг/мл алкалоидов	22,00±0,12	28,50±0,26	1,295±0,013
7	50 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	57,00±0,35	59,50±0,33	1,044±0,011
8	100 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	55,50±0,40	59,50±0,33	1,072±0,011
9	200 мкМ GSH + 500 мкг/мл алкалоидов	53,00±0,36	59,50±0,33	1,123±0,012

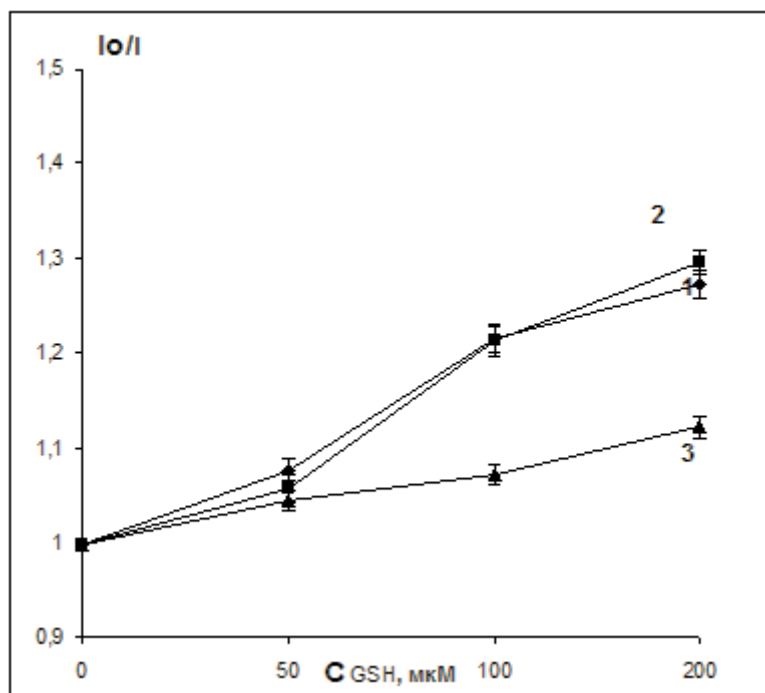


Рисунок 2.

Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции алкалоидов восстановленным глутатионом (C_{GSH}) *in vitro*: 1 - 100 мкг/мл алкалоидов, 2 - 200 мкг/мл алкалоидов; 3 - 500 мкг/мл алкалоидов.

Это подтверждает наше предположение о возможности прямого взаимодействия тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.* с восстановленным глутатионом по свободным SH-группам цистеиновых остатков в его молекуле. Вероятно, указанные соединения при взаимодействии между собой не образуют достаточно прочные и долгоживущие комплексы, а находятся в динамическом равновесии (свободная и связанная форма) с очень быстрым временем перехода между данными состояниями.

Факт отклонения графиков в координатах Штерна–Фольмера от прямолинейной зависимости в сторону оси ОХ указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, но с различной степенью сродства к глутатиону, что подтверждается многокомпонентным составом препарата [1, 2].

На основании анализа полученных данных, наиболее вероятным в данном случае является статический механизм тушения флуоресценции тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.* восстановленным глутатионом, который предполагает образование нефлуоресцирующих комплексов между молекулами донора и акцептора в основном состоянии. Образование комплексов между исследуемыми соединениями возможно еще и потому, что взаимодействующие молекулы имеют противоположные заряды (так, восстановленный глутатион имеет в своем составе остаток глутаминовой кислоты, отрицательно заряженной при нейтральных значениях pH, и, с другой стороны, – положительно заряженные тиофосфорные производные алкалоидов чистотела). А так как на сближение флуорофора и тушителя значимо влияет заряд молекул, в такой же степени, как и стерические факторы, – это увеличивает вероятность их сближения и непосредственного взаимодействия [12].

Вероятен также вклад донорно–акцепторного взаимодействия между соединениями, посредством образования комплексов с переносом заряда.

Из анализа обоих графиков (рис. 2) видно, что наилучшие результаты (тушение флуоресценции) получены при взаимодействии глутатиона с алкалоидами в концентрации 100 и 200 мкг/мл, а при их концентрации 500 мкг/мл, эффект тушения флуоресценции невелик. Это, по-видимому, объясняется высокой концентрацией добавленных алкалоидов, тушение флуоресценции которых не удаётся осуществить заданными концентрациями восстановленного глутатиона *in vitro*.

Расчёт значения равновесной константы ассоциации восстановленного глутатиона с алкалоидами проводили по уравнению Штерна–Фольмера: $I_0/I = 1 + K_{sv} [GSH]$, исходя из данных графика (рис. 2): $K_{sv1}=0,0021 \text{ мкМ}^{-1}$; $K_{sv2}=0,0015 \text{ мкМ}^{-1}$. Полученные значения констант ассоциации доказывают факт взаимодействия между исследуемыми соединениями и подтверждают наличие в растворе одного типа флуорофора (тиофосфорные производные отдельных алкалоидов чистотела), но с различной степенью сродства к глутатиону.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о возможности непосредственного взаимодействия восстановленного глутатиона с тиофосфорными производными алкалоидов *Chelidonium majus L.*

Анализируя полученные данные, можно предположить аналогичное взаимодействие тиофосфорных производных алкалоидов чистотела с SH-группами аминокислотных остатков, входящих в состав активных центров ряда ключевых ферментов метаболизма аминокислот и их производных. Указанное взаимодействие приводит к конформационным изменениям в молекуле этих ферментов, в результате чего изменяется их функциональная активность, изменяется метаболизм аминокислот и их производных, которые, в свою очередь, являясь незаменимым пластическим субстратом для клеток [14], определяют активность и характер процессов злокачественного роста [15].

Аналогичные взаимодействия алкалоидов чистотела с тиоловыми группами протеинов в тканях при карциноме [16], изменения функциональной активности некоторыми изохинолиновыми алкалоидами ряда ферментов, в частности,

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНА С ТИОФОСФАТАМИ АЛКАЛОИДОВ

SH-зависимых мембраносвязанных катионтранспортных АТФаз [6], ферментов нейромедиаторного обмена - ацетилхолинэстеразы [17, 18] и моноаминооксидазы [18, 19], - а также лизосомальных ферментов [20] убедительно доказывают возможность такого взаимодействия.

Полученные данные расширяют представления о биохимических механизмах противоопухолевого действия алкалоидов чистотела и их тиофосфорных производных и должны учитываться при их практическом применении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hohenwarter O., Strutzenberger K., Katinger H., Liepins A., Nowicky J.W.* (1992) *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **18**, 1.
2. *Nowicky J.W., Hiesmayr W., Liepins A.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **22**, 9-20.
3. *Roublevskaia I.N., Polevoda B.V., Ludlow J.W., Haake A.R.* (2000) *Anticancer Res.*, **20**, 3163-3167.
4. *Liepins A., Nowicky J.W., Bustamante J.O., Lam E.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **22**, 1-8.
5. *Uglanitsa K.N., Fomin K.A., Nefyodov L.I., Nowicky J.W., Brzosko W.J.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **22**, 63-66.
6. *Фаддеева М.Д., Беляева Т.Н.* (1997) *Цитология*, **39**(2/3), 181-208.
7. *Azz A., Boscoboinik D., Hensey C.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **208**, 547-554.
8. *Han Q.P.* (1996.) *J. Med. Chem.*, **39**, 1494-1508.
9. *Han Q.* (1996.) *Dissert. Abst. Internat.*, **56**(11), 6076B.
10. *Sedlak J., Lindsay R.* (1968) *Analyt. Biochem.*, **25**(1), 192-205.
11. *Fahey R.C., Brody S., Mikolajczyk S.D.* (1975) *J. Bacteriol.*, **121**, 144-151.
12. *Lakowicz J.R.* (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2nd ed.), Plenum Press, NewYork.
13. *Эмануэль Н.М., Кузьмина М.Г.* (1985) *Экспериментальные методы химической кинетики*, МГУ, М.
14. *Bender D.A.* (1975) *Amino Acid Metabolism*, J. Willey & Sons, NewYork.
15. *Берёзов Т.Т.* (1982) *Вестник АМН СССР*, **9**, 19-24.
16. *Kulik G.I.* (1998) *Drug Exp. Clin. Res.*, **24**, 335-337.
17. *Кузнецова Л.П., Никольская Е.Б., Сочилина Е.Е., Фаддеева М.Д.* (2002) *Ж. эволюц. биох. и физиол.*, **38**(1), 28-31.
18. *Кузнецова Л.П., Сочилина Е.Е., Ягодина О.В., Фаддеева М.Д.* (2005) *Укр. биохим. журн.*, **77**(2), 147-153.
19. *Ягодина О.В., Никольская Е.Б., Фаддеева М.Д.* (2003) *Цитология*, **45**(10), 1032-1037.
20. *Belyaeva T., Leontieva E., Shpakov A., Mozhenok T., Faddejeva M.* (2003) *Cell Biol. Internat.*, **27**, 887-895.

Поступила: 14. 01. 2008.

**REDUCED GLUTATHIONE INTERACTION WITH THIOPHOSPHORIC DERIVATIVES OF
ALKALOIDS OF *CHELIDONIUM MAJUS L. IN VITRO***

A. Glazev, L. Nefyodov

Laboratory of Biochemistry of Biologically Active Substances Yanka Kupala State University of
Grodno, Belarus, 52, BLK, Grodno, 230017 Belarus, tel./fax: +375 (152) 48 75 41;
tel. +375 (29) 63 76 982; e-mail: l.nefyodov@grsu.by, www.nil.grsu.by

The interaction between reduced glutathione and thiophosphoric derivatives of alkaloids of greater celandine was studied by the photometric method of analysis and fluorescence spectroscopy *in vitro*.

Results demonstrate possibility of specific interaction between reduced glutathione and thiophosphoric derivatives of alkaloids.

It is possible that similar interaction of thiophosphoric derivatives of alkaloids may involve SH-groups of amino-acid residues, at the active sites of some metabolic enzymes.

Key words: reduced glutathione, thiophosphoric derivatives of alkaloids, effect of extinguishing of fluorescence.