



УДК 577.352.2+577.152.315

© 2008

Е. М. Филинская, Т. В. Рыбальченко, Г. В. Островская,
В. Г. Маханькова, С. В. Яблонская, В. Н. Кокозей,
В. К. Рыбальченко

Мембранотропная активность гетерополиядерных комплексов Cu(II)/Co(III) с диэтанололамином

(Представлено академиком НАН Украины В. В. Скопенко)

It is established that thiocyanate and acetate heteropolynuclear complexes of Cu(II)/Co(III) with diethanolamine are characterized by a more significant membrane-tropic activity than that of the other studied complexes. It is supposed that the influence of heteropolynuclear complexes on the membrane-bound enzyme activity depends on the membrane-tropic activity of these complexes and their ability to penetrate into the lipid matrix.

Гетерополиядерные комплексы Cu(II)/Co(III) с диэтанололамином, полученные прямым синтезом [1], проявляют антифитовирусную и противоопухолевую активности [2, 3].

Данная работа посвящена изучению действия гетерополиядерных комплексов $[\text{Cu}_2\text{Co}_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{L})_4]\text{X}_2$ (H_2L , L — диэтанололамин и его депротонированный остаток; X=Cl, Br, I, NCS, CH_3COO) на липидный матрикс мембраны, *экто*-АТФазную, Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную и Na^+ , K^+ -АТФазную активности плазматической мембраны гепатоцитов крыс с целью установления механизмов их мембранотропной активности. Комплексы, содержащие тот или иной анион, обозначали соответственно C^{Cl} , C^{Br} , C^{I} , C^{NCS} , C^{Ac} .

Исследование взаимодействия гетерополиядерных комплексов с липидными монослойными мембранами проводили на границе раздела фаз раствор электролита — монослой липидов — воздух [4]. Монослой липидов формировали путем нанесения раствора азолектина (суммарная фракция фосфолипидов бобов сои) в хлороформе на поверхность субфазы (10 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л *трис*-HCl, pH 7,4). Плоские бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ) формировали нанесением раствора фосфатидилхолина в *n*-декане (23–25 мг/мл) на отверстие ($\varnothing 0,8$ мм) в тефлоновом стаканчике, погруженном в раствор KCl с концентрацией 100 ммоль/л [5]. Плазматические мембраны (ПМ) клеток печени крыс выделяли методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [6]. Содержание белка в полученной фракции определяли по методу Lowry et al. [7]. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность (КФ 3.6.1.38) ПМ гепатоцитов определяли в среде, содержащей 20 мкг белка фракции ПМ, 30 мкмоль/л ЭГТА, 50 ммоль/л *трис*-HCl, 70 ммоль/л

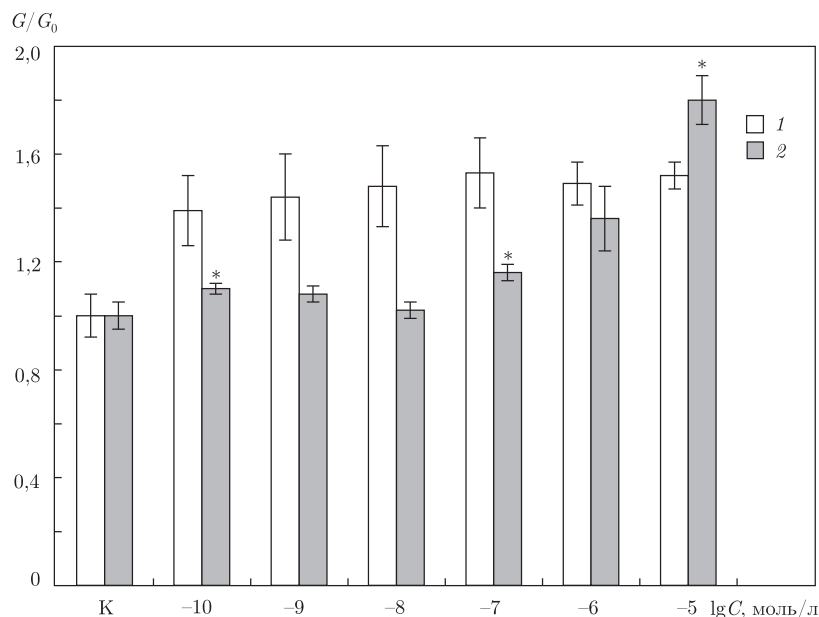


Рис. 1. Концентрационная зависимость относительных изменений электрической проводимости БЛМ при действии тиоцианатного (C^{NCS}) и ацетатного (C^{Ac}) комплексов:

G — электрическая проводимость БЛМ при действии исследованных комплексов; G_0 — электрическая проводимость немодифицированных БЛМ; К (здесь и на рис. 2, 3) — контроль немодифицированных комплексами мембран.

Звездочка (*) — $p < 0,01$ по отношению к контролю; 1 — C^{Ac} , 2 — C^{NCS}

KCl, 3 ммоль/л Mg-АТФ, pH 7,5, фермент активировали добавлением $CaCl_2$ с концентрацией 10 мкмоль/л. Экто-АТФазную активность (КФ 3.6.1.3) определяли в среде, содержащей 20 мкг белка фракции ПМ, 140 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 50 ммоль/л *tris*-HCl, 1 ммоль/л АТФ, pH 7,5. Фермент активировали добавлением $CaCl_2$ с концентрацией 2 ммоль/л [8]. Для определения Na^+, K^+ -АТФазной активности (КФ 3.6.1.37) ПМ гепатоцитов за основу взят метод Pressley et al. [9]. Na^+, K^+ -АТФазную активность определяли в среде, содержащей 100 ммоль/л NaCl, 20 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л $MgCl_2$, 0,5 ммоль/л EDTA, $5 \cdot 10^{-7}$ ммоль/л SDS, 50 ммоль/л *tris*-HCl, 5 ммоль/л АТФ, $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л уабаин и без него, pH 7,5. Количество неорганического фосфата, который выделился в результате ферментативной реакции, определяли методом Ратбуна–Бетлах [10].

При исследовании взаимодействия гетерополиядерных комплексов Cu(II)/Co(III) с моно- и бимолекулярными липидными мембранами в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-10}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л установлено, что галогенидные комплексы (C^{Cl} , C^{Br} , C^{I}) не вызывают значительных изменений двумерного давления и граничного скачка потенциала мономолекулярных липидных мембран, а также электрических параметров БЛМ. Тиоцианатный (C^{NCS}) и ацетатный (C^{Ac}) комплексы в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л увеличивают двумерное давление монослойных мембран до 5,6 мН/м ($\Pi_0 = (6,9 \pm 0,8)$ мН/м) и электрическую проводимость БЛМ при постоянных значениях электрической емкости. Так, C^{NCS} -комплекс при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л (рис. 1) максимально увеличивает электрическую проводимость в 1,7 раза ($p < 0,01$) ($G_0 = (30,91 \pm 2,47)$ нСм/см²). C^{Ac} -комплекс увеличивает электрическую проводимость БЛМ на 52% при $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л ($G_0 = (27,72 \pm 1,38)$ нСм/см²), при последующем повышении концентрации электропроводимость мембран существенно не

изменяется. Представленные данные свидетельствуют о том, что галогенидные комплексы (C^{Cl} , C^{Br} , C^I) при взаимодействии с мембраной, адсорбируются в зоне полярных головок липидов, тогда как тиоцианатный (C^{NCS}) и ацетатный (C^{Ac}) комплексы активно взаимодействуют с липидным матриксом мембраны, инкорпорируясь в его гидрофобную зону.

Определение мембранотропной активности гетерополиядерных комплексов послужило основанием для проведения исследований на биологических мембранах. Изучая влияние веществ на активность мембраносвязанных ферментов, мы выбрали комплексы с наиболее выраженной мембранотропностью (тиоцианатный C^{NCS} -комплекс) и с наименее выраженной (хлоридный (C^{Cl}) и бромидный (C^{Br}) комплексы).

Чистоту выделенной фракции ПМ определяли по маркерным ферментам — 5'-нуклеотидазной и глюкозо-6-фосфатазной активностям. 5'-Нуклеотидазная активность фракции ПМ в 11 раз превышает ферментативную активность гомогената. Глюкозо-6-фосфатазная активность ПМ в 6 раз ниже, чем ферментативная активность в микросомальной фракции. Исходя из изложенного можно утверждать, что полученная нами фракция ПМ в достаточной мере очищена.

В немодифицированных гетерополиядерными комплексами мембран гепатоцитов крыс среднее значение *экто*-АТФазной активности составляет $(99,1 \pm 9,7)$ нмоль Φ_n /(мин·мг) белка. Гетерополиядерные комплексы C^{Cl} и C^{NCS} в концентрациях от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л не вызывают заметных изменений *экто*-АТФазной активности. C^{Br} -Комплекс в данном диапазоне концентрации несколько угнетает ферментативную активность мембран. Максимальное снижение *экто*-АТФазной активности наблюдается при концентрации веществ $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При действии C^{Br} -комплекса активность фермента угнетается на 90%, C^{NCS} — на 80% и C^{Cl} — на 70%. Учитывая тот факт, что АТФ-гидролизующий центр *экто*-АТФазы локализован на наружной поверхности мембраны [8], можно предположить, что угнетающее действие исследованных веществ является следствием непосредственного взаимодействия гетерополиядерных комплексов с “наружным” сайтом молекулы фермента.

Среднее значение Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазной активности у немодифицированных гетерополиядерными комплексами ПМ гепатоцитов составляет $(21,90 \pm 3,35)$ нмоль Φ_n /(мин·мг) белка. C^{Cl} -Комплекс в концентрациях от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л снижает ферментативную активность (рис. 2), а при концентрациях от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активность ПМ увеличивается на 40%. C^{Br} -Комплекс, наоборот, в концентрациях от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л угнетает ферментативную активность до 50%, с увеличением концентраций ферментативная активность мембран практически не изменяется. При действии C^{NCS} -комплекса на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность ПМ установлена параболическая зависимость: при концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л ферментативная активность увеличивается в 1,5 раза, при $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л — в 2,4 раза, а при $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л ферментативная активность уменьшается в 2 раза.

Подобные результаты получены и при исследовании воздействия гетерополиядерных комплексов на Na^+ , K^+ -АТФазную активность ПМ. C^{Cl} -Комплекс в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л уменьшает Na^+ , K^+ -АТФазную активность ПМ (рис. 3), среднее значение которой в немодифицированных мембранах составляет $(70,6 \pm 6,9)$ нмоль Φ_n /(мин·мг) белка. При этом максимальное уменьшение ферментативной активности (на 80%) наблюдается при концентрации вещества $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. C^{NCS} -Комплекс вызывает противоположный эффект — повышает АТФазную активность ПМ, максимально на 52% при концентрации вещества $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Таким образом, все исследованные гете-

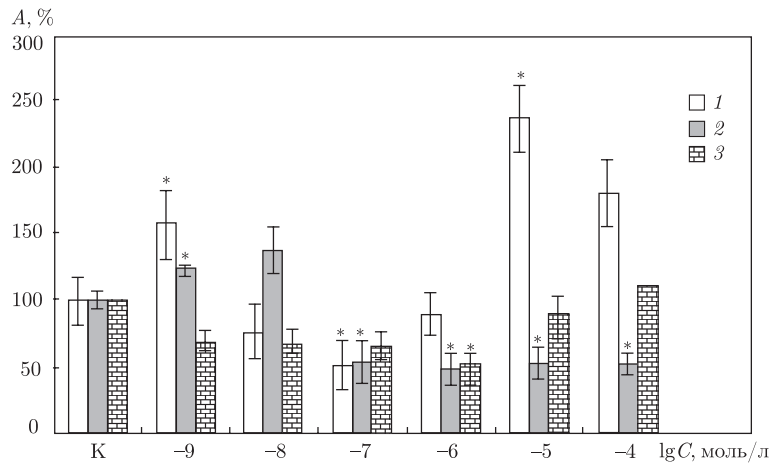


Рис. 2. Mg²⁺, Ca²⁺-АТФазная активность ПМ гепатоцитов крыс при действии тиоцианатного (C^{NCS}), хлоридного (C^{Cl}) и бромидного (C^{Br}) комплексов. А, % — АТФазная активность ПМ. Звездочка (*) — $p < 0,05$ по отношению к контролю; 1 — C^{NCS}, 2 — C^{Cl}, 3 — C^{Br}

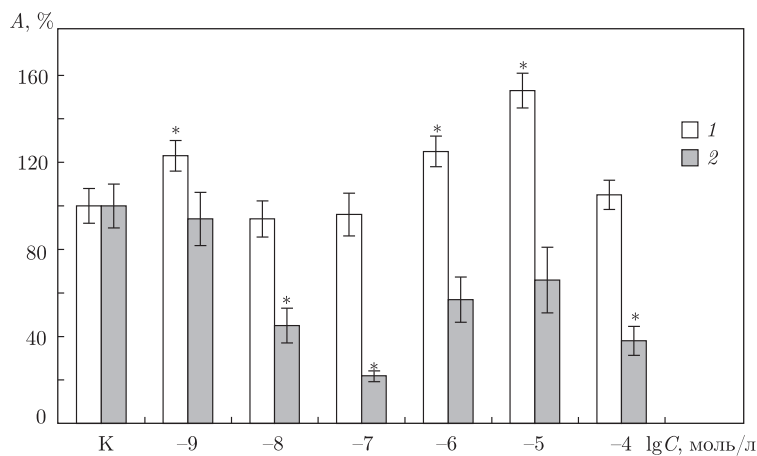


Рис. 3. Na⁺, K⁺-АТФазная активность ПМ гепатоцитов крыс при действии тиоцианатного (C^{NCS}) и хлоридного (C^{Cl}) комплексов. А, % — АТФазная активность ПМ. Звездочка (*) — $p < 0,05$ по отношению к контролю; 1 — C^{NCS}, 2 — C^{Cl}

рополиядерные комплексы разнонаправлено влияют на Mg²⁺, Ca²⁺- и Na⁺, K⁺-АТФазную активность ПМ гепатоцитов: C^{Cl}- и C^{Br}-комплексы угнетают активность мембраносвязанных ферментов, а C^{NCS}-комплекс активизирует ферменты.

Разнонаправленные изменения АТФазных активностей ПМ гепатоцитов при условии влияния гетерополиядерных комплексов можно объяснить, исходя из мембранотропных свойств исследованных веществ. C^{Cl}- и C^{Br}-комплексы характеризуются слабым взаимодействием с липидным матриксом мембраны, которое ограничивается адсорбцией на поверхности мембраны в области полярных головок липидов за счет электростатических взаимодействий, о чем свидетельствуют незначительные изменения механических и электрических параметров искусственных мембран. Следовательно, адсорбируясь на поверхности липидного слоя, хлоридный (C^{Cl}) и бромидный (C^{Br}) комплексы могут непосредственно взаимодействовать с внеклеточными петлевыми доменами молекулы АТФазы, изменять их конформацию, и тем самым изменять аффинность фермента к активирующему действию

ионов Ca^{2+} , что в результате ведет к понижению активности мембраносвязанных ферментов. Тиоцианатный комплекс (C^{NCS}) характеризуется более выраженными мембранотропными свойствами по сравнению с $\text{C}^{\text{Cl-}}$ и $\text{C}^{\text{Br-}}$ -комплексами. При минимально действующих концентрациях тиоцианатный комплекс, так же как и $\text{C}^{\text{Cl-}}$ и $\text{C}^{\text{Br-}}$ -комплексы, адсорбируется на поверхности мембраны, взаимодействуя только с поверхностными доменами молекулы фермента. Начиная с микромолярных концентраций, C^{NCS} -комплекс более активно инкорпорируется в липидный матрикс мембраны. При проникновении вещества в гидрофобную зону ПМ клеток может быть задействован дополнительный механизм влияния на ферментативную активность — оно может не только непосредственно модифицировать структуру мембранных ферментов, но и влиять на их активность путем изменения физико-химических свойств самого липидного матрикса.

Таким образом, по результатами экспериментальных исследований можно предположить, что изменение активности мембраносвязанных ферментов происходит по двум механизмам: первый — путем непосредственного действия на молекулу фермента, что приводит к изменению его конформации. Именно такое действие характерно для $\text{C}^{\text{Cl-}}$ и $\text{C}^{\text{Br-}}$ -комплексов. Второй — при взаимодействии с мембраной комплексы изменяют физико-химические свойства липидного матрикса и в результате — функциональную активность мембраносвязанных ферментов. Такой тип взаимодействия присущ тиоцианатному комплексу (C^{NCS}), который имеет более выраженные мембранотропные свойства по сравнению с хлоридным и бромидным комплексами.

1. *Makhankova V. G., Vassilyeva O. Y., Kozozay V. N. et al.* Formation, structures, magnetic and EPR spectroscopic properties of dicobalt(III)-dicopper(II) complexes featuring heterotetranuclear cations of a puckered cyclic structure with diethanolamine and diethanolamine(2-) as bridging ligands // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2002. – No 8. – P. 2163–2169.
2. *Скопенко В. В., Бойко А. Л., Полищук В. П. и др.* Влияние гетерометаллических комплексов меди и кобальта с аминоспиртами на инфекционную активность вирусов // *Вісн. Київ. ун-ту. Біологія.* – 2001. – № 35. – С. 21–23.
3. *Пат. № 42461.* – А Україна, МПК C01G 1/00, A 61K 31/13, A61K 31/30. Гетерометалічні комплекси міді (II) та кобальту (III) з діетаноламіном, що виявляють протипухлинну дію / В. В. Скопенко, О. Ю. Васильєва, В. Г. Маханькова, В. М. Козозей, В. О. Шляховенко. – № 2001031539. – Заявл. 06.03.2001. – Опубл. 15.10.2001.
4. *Гевод В. С., Решетняк И. Л., Шамонина А. М., Рыбальченко В. К.* Взаимодействие ангиотензина с липидными монослоями // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 1993. – **115**, № 7. – С. 92–94.
5. *Омельченко А. М., Бовыкин Б. А., Сытник Т. В.* Изменение емкости бислоиных липидных мембран методом нестационарных циклических вольт-амперных характеристик // *Молекул. ген. и биофиз.* – 1990. – Вып. 15. – С. 17–20.
6. *Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B., Kappas A.* Plasma membranes of the rat liver isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi // *J. Cell Biol.* – 1969. – **41**, No 1. – P. 124–131.
7. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
8. *Heine P., Braun N., Heilbronn H., Zimmermann H.* Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – **262**. – P. 102–107.
9. *Pressley T. A., Haber R. S., Loeb J. N. et al.* Stimulation of Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase and active transport by low external K^+ in a rat liver cell line // *J. Gen. Physiol.* – 1986. – **87**, No 4. – P. 591–606.
10. *Rathbun W. B., Betlach M. V.* Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // *Anal. Biochem.* – 1969. – **28**. – P. 436.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Поступило в редакцію 01.10.2007