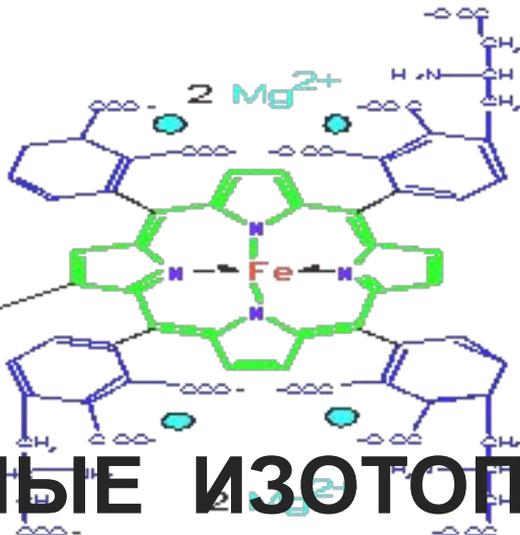




РНИМУ

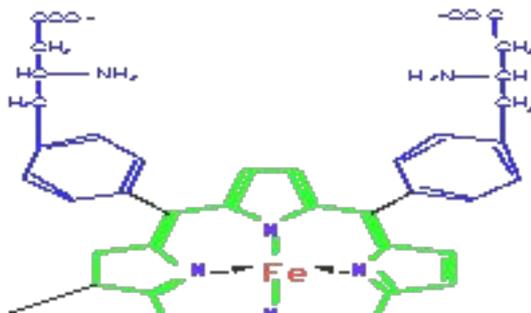
имени Н.И. ПИРОГОВА



МАГНИТНЫЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ (МИЭ)

В МЕТАЛЛ-ЗАВИСИМОМ ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ И ИХ РОЛЬ В ФАРМАКОЛОГИИ

Нанокатиониты



Магнитный изотопный эффект

выражается в **зависимости скорости химической реакции** (или вероятности рождения молекулы)

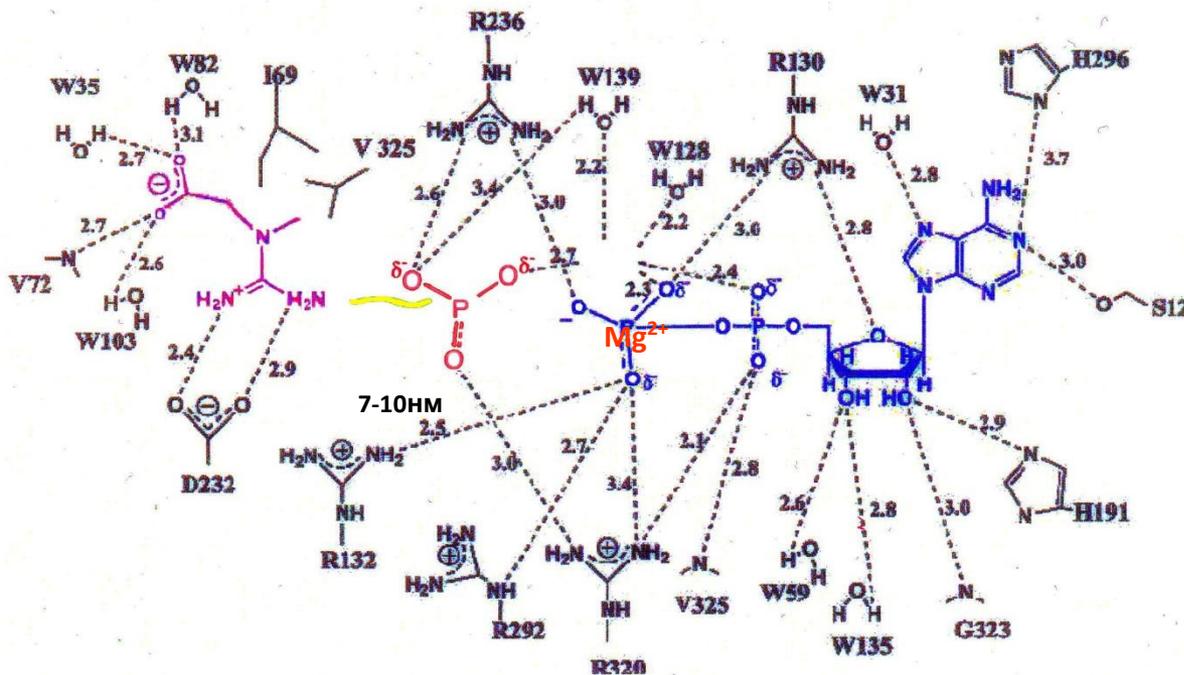
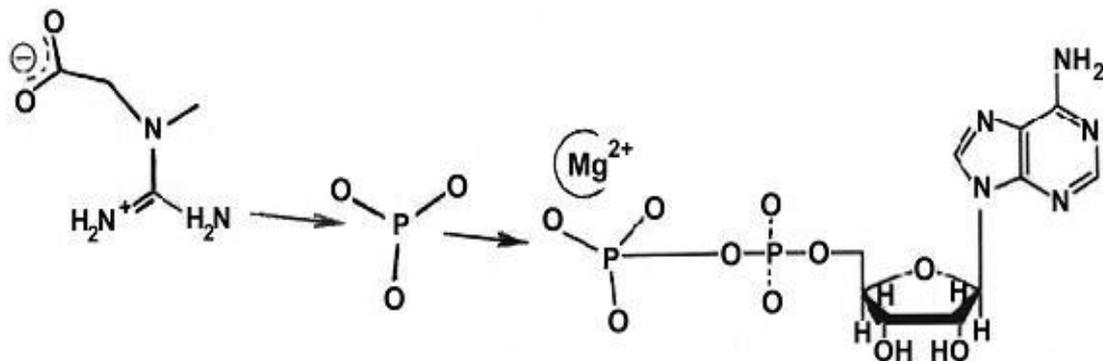
от ядерного спина,
его проекции,
магнитного момента и
энергии электро-ядерного (*сверхтонкого Кулоновского*) взаимодействия.

Step E.N.// Chem. Phys. Lett. 1991. 186. P. 405.

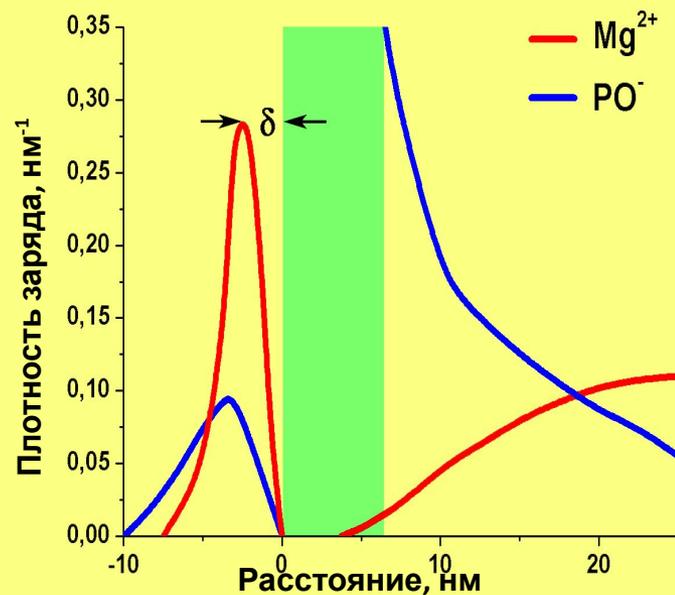
Распространенность изотопов биологически активных двухвалентных металлов в природе

Нуклид	Распространенность в природе, %	Ядерный спин	Ядерный магнитный момент, μ
^{24}Mg	78,99	0	
^{25}Mg	10,00	+5/2	-0,85545
^{26}Mg	11,01	0	
^{64}Zn	48,6	0	
^{66}Zn	27,9	0	
^{67}Zn	4,1	-5/2	+0,87515
^{68}Zn	18,8	0	
^{70}Zn	0,6	0	
^{40}Ca	96.94	0	
^{43}Ca	1.317	-7/2	+0,87515

Нанотопология активного сайта



Влияние нанотопологии каталитического сайта КК на перекрывание электронных плотностей реагентов

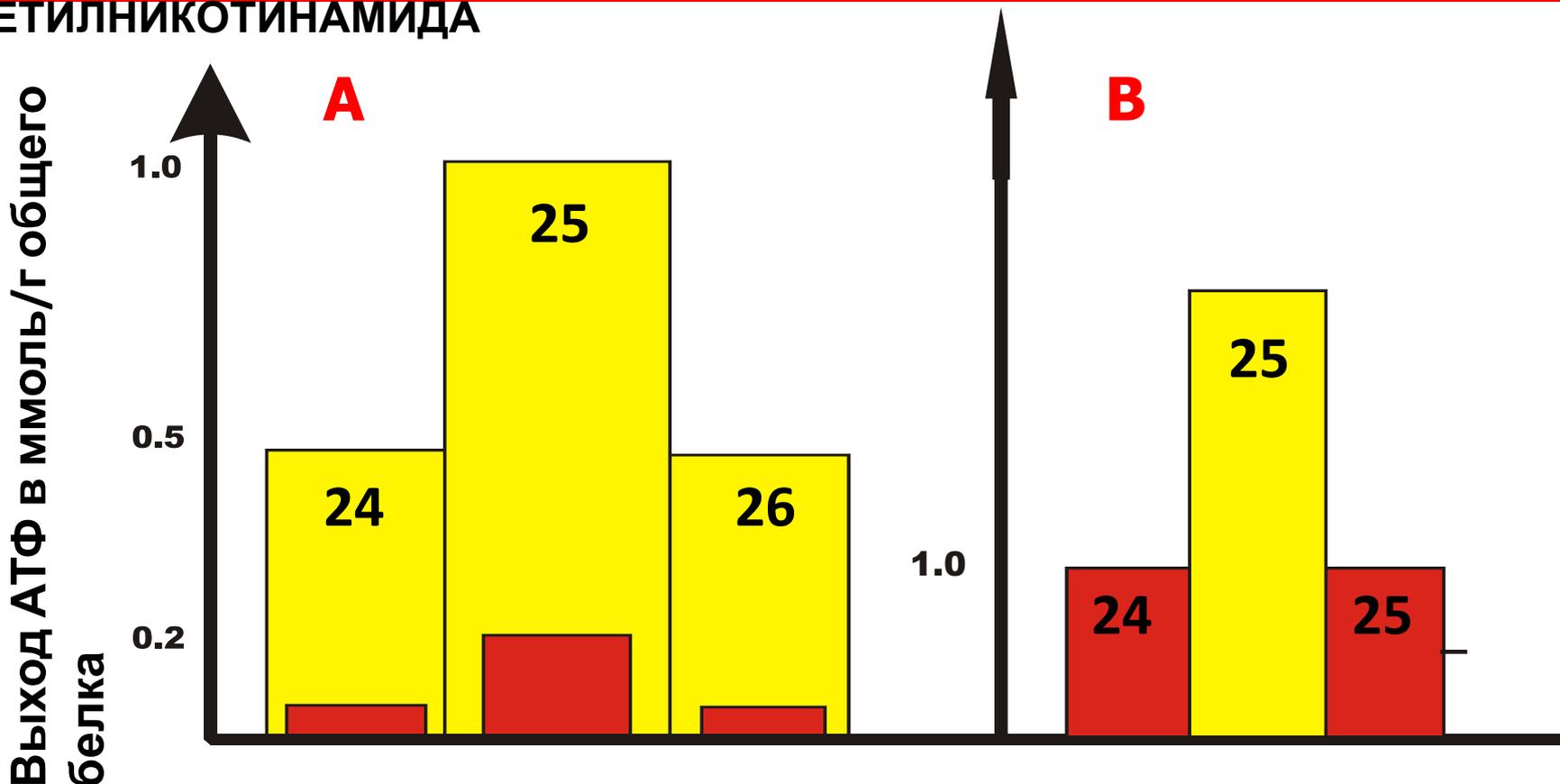


Комбинированное решение уравнений Шредингера и Пуассона

Скорость образования АТФ митохондрией (А) и креатинкиназой (В) как функция изотопа Mg

ИНТАКТНАЯ

МИТОХОНДРИЯ, ПОДВЕРГНУТАЯ СЕЛЕКТИВНОЙ БЛОКАДЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ 1-МЕТИЛНИКОТИНАМИДА



Формирование ион-радикальных пар (Синглет-триплетный каналы фосфорилирования)

Магнитный изотопный эффект $^{25}\text{Mg}^{2+}$ в регуляции митохондриального синтеза АТФ, осуществляемого креатинкиназой

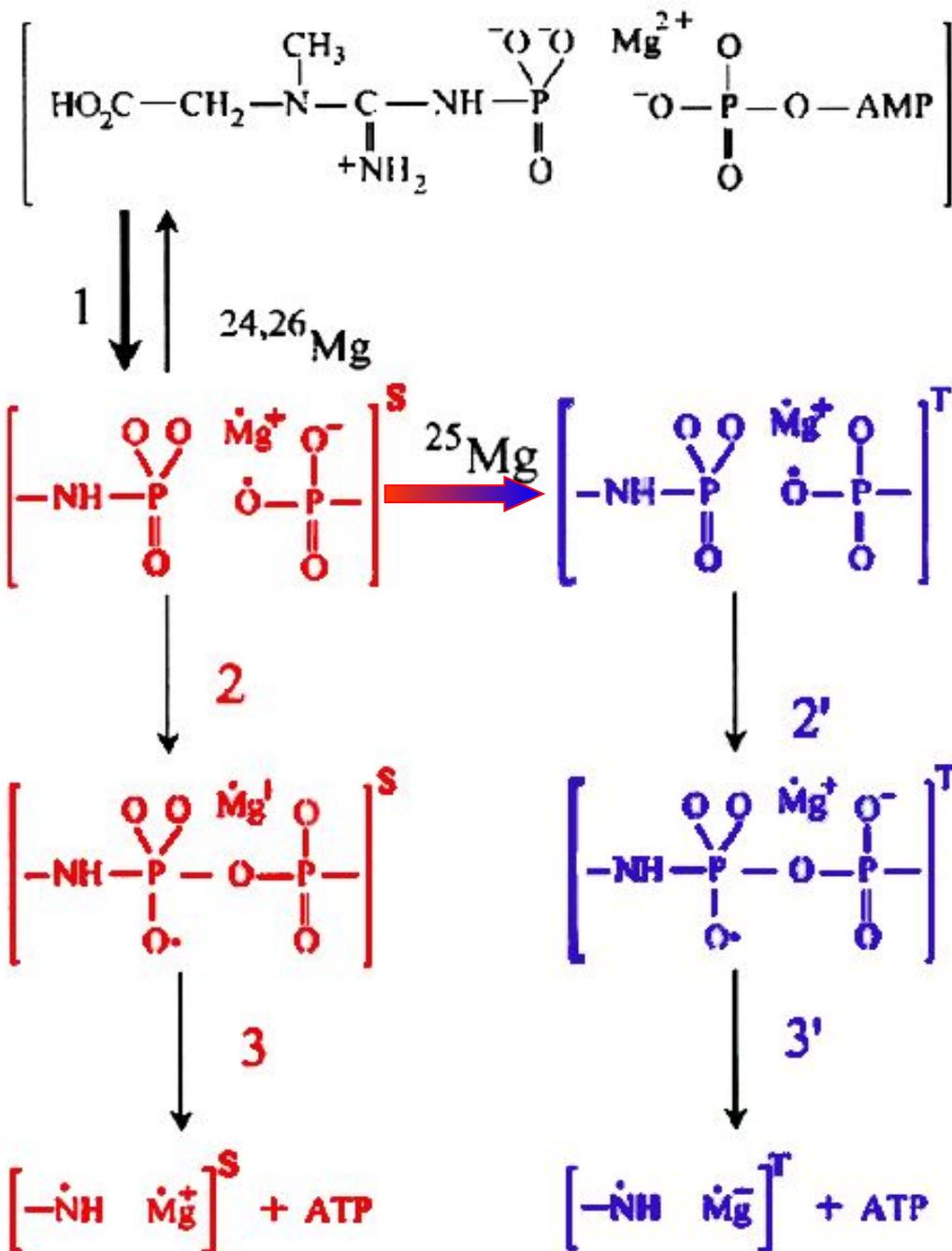
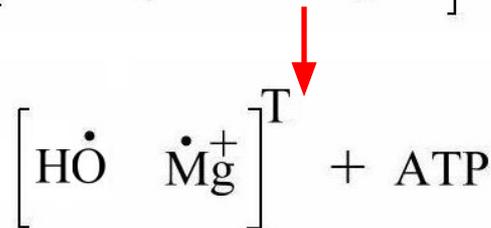
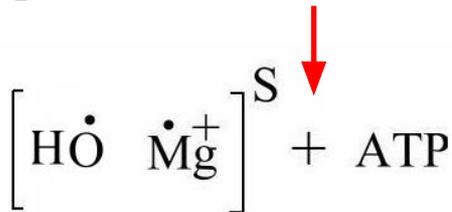
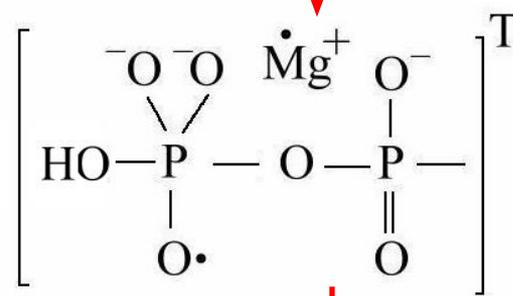
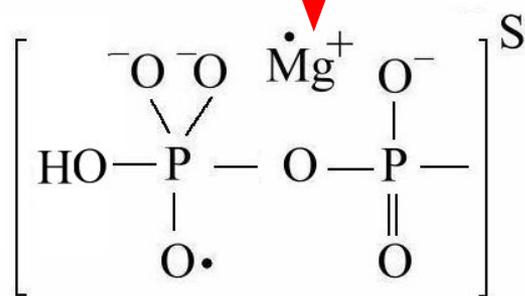
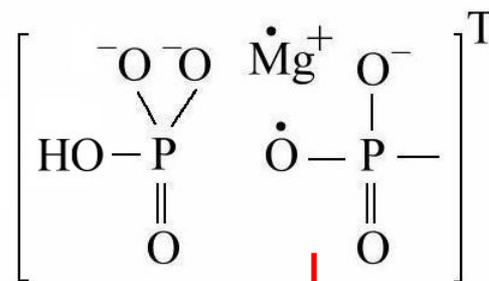
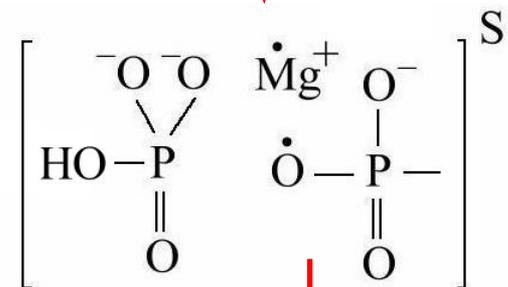
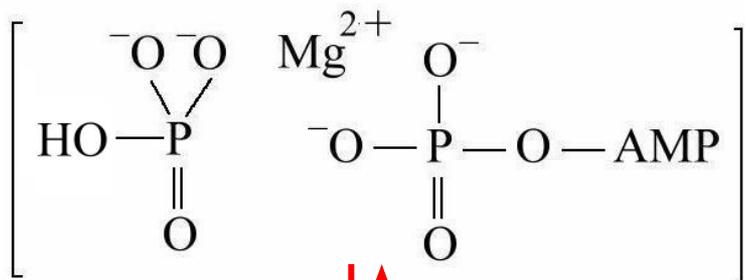
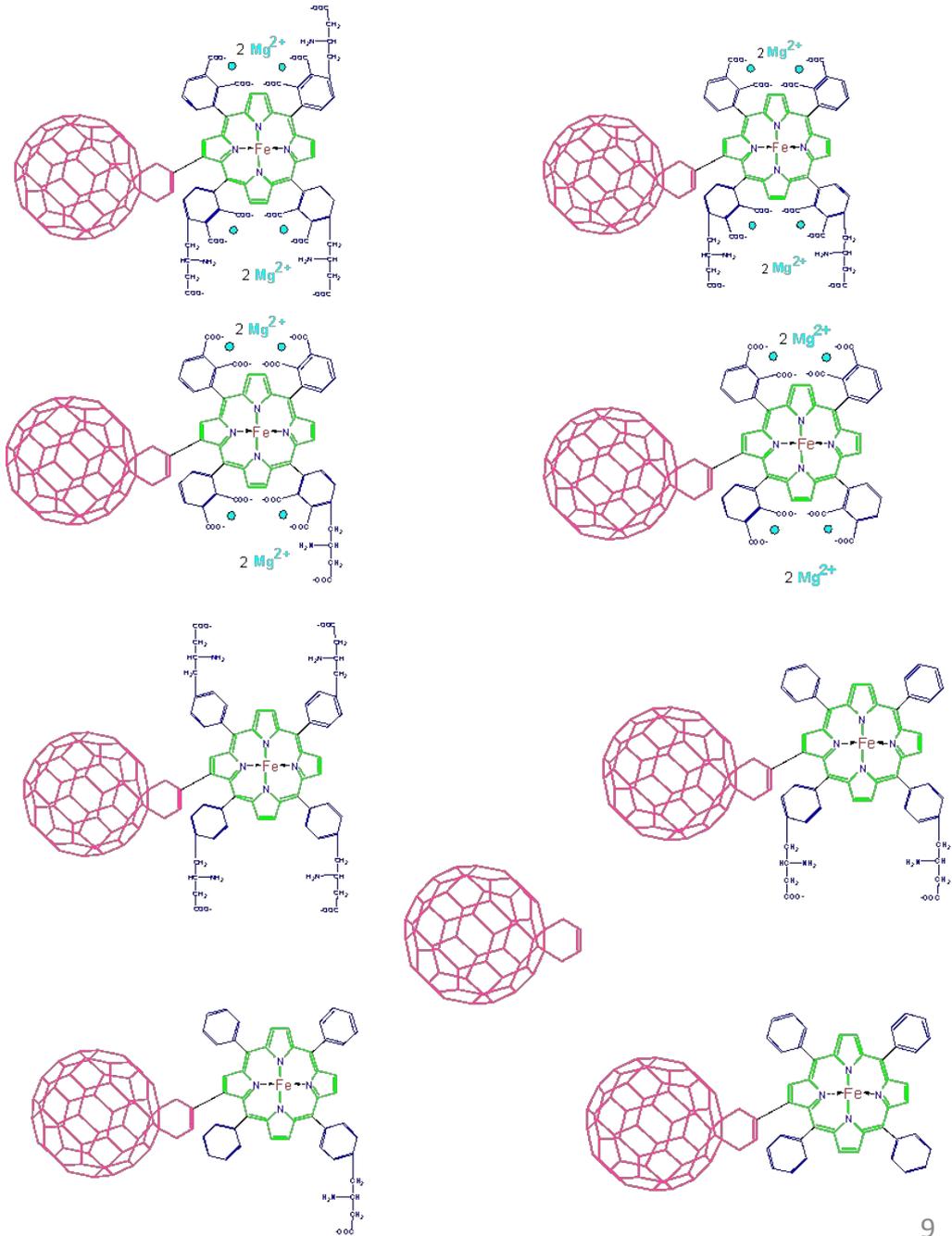


Схема реакции фосфорилирования с помощью АТФ синтазы

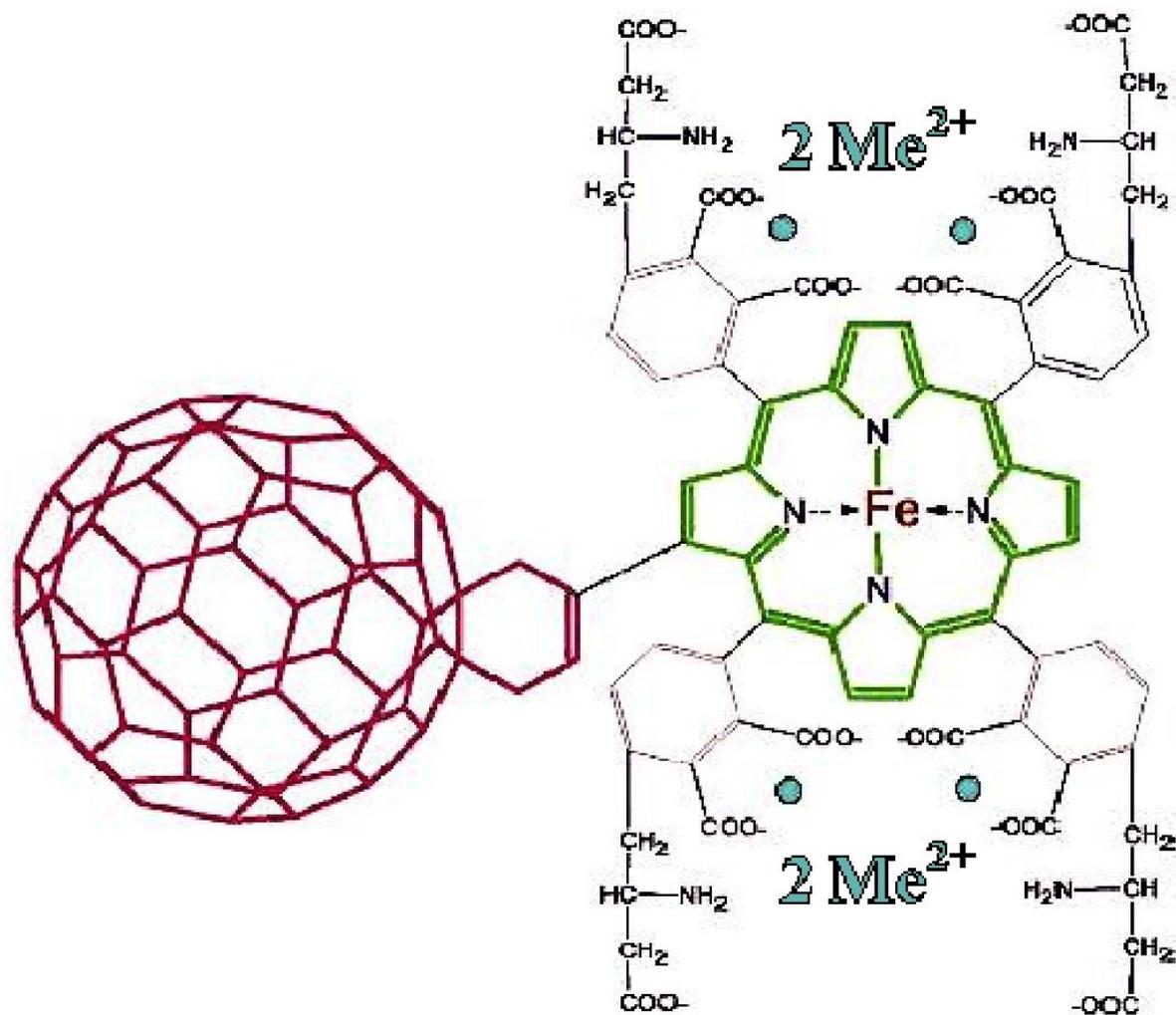


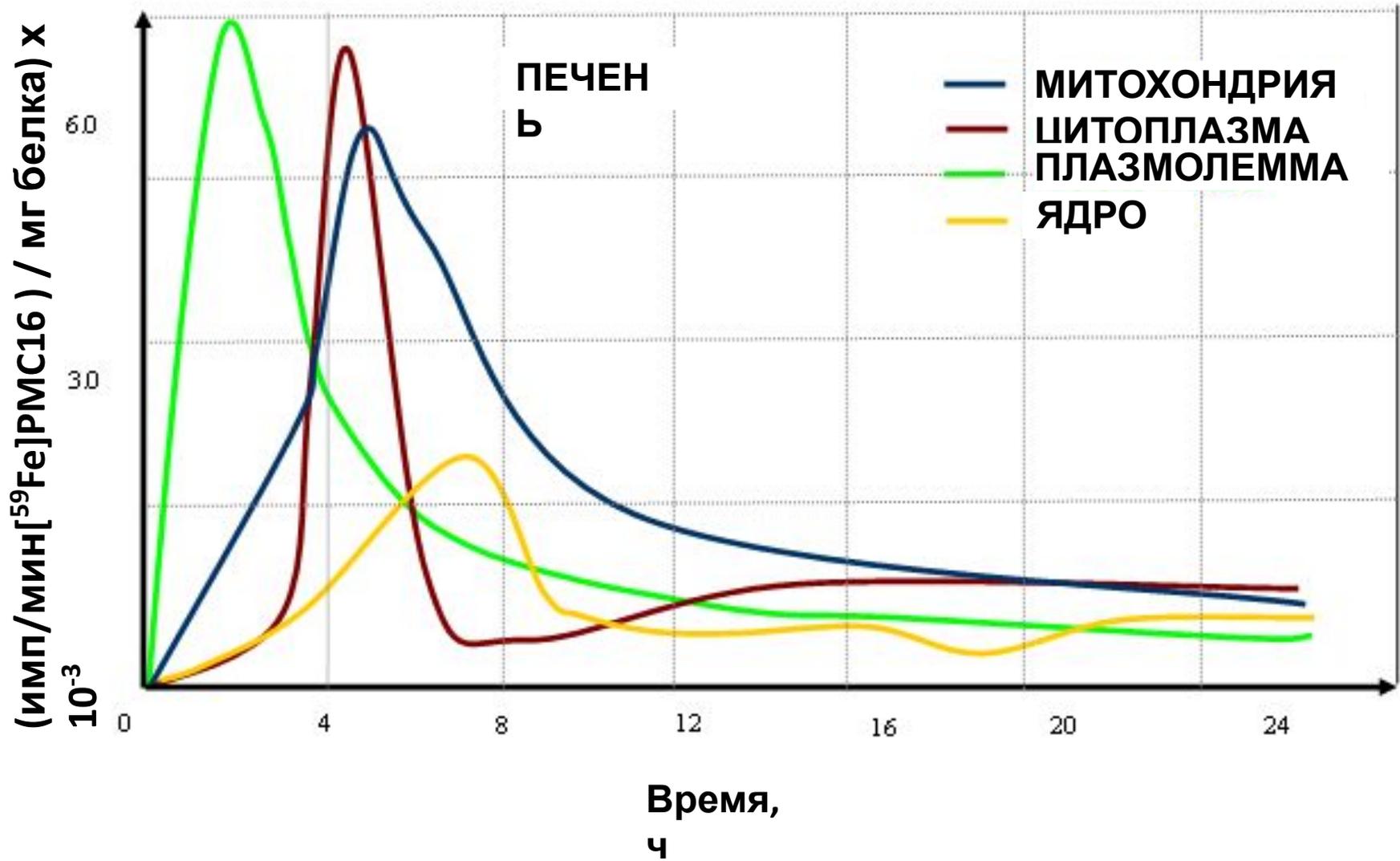
НАНОКАТИОНЫ

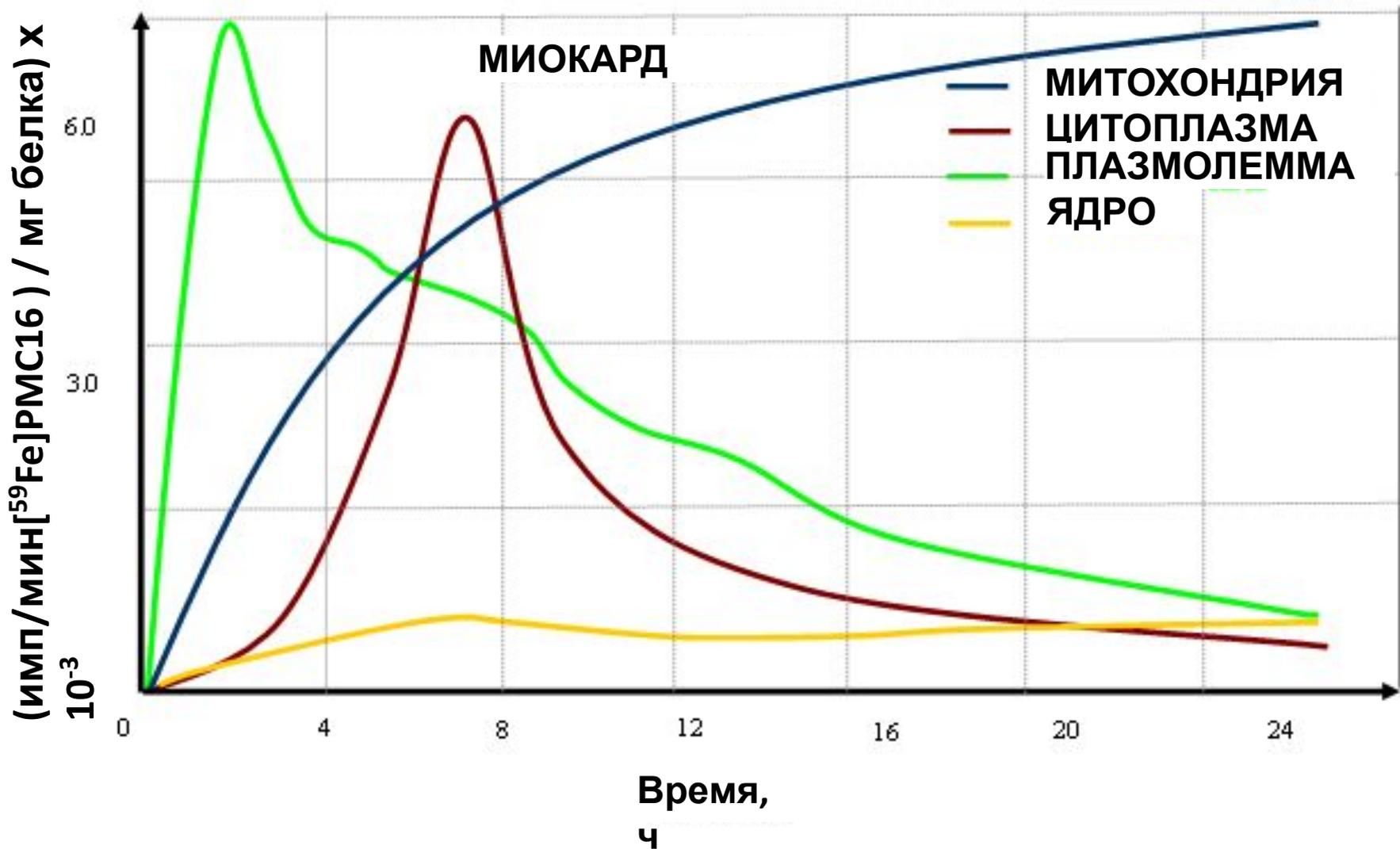
ФВ способны переносить катионы металлов и «отдавать» их в условиях избытка положительных зарядов в окружающей среде (**метаболический ацидоз**)



Структура РМС-16 (Пат. EP 1992627A1, 2007)







ФАРМАКОКИНЕТИКА [Mg]PMS16 (КРЫСЫ)

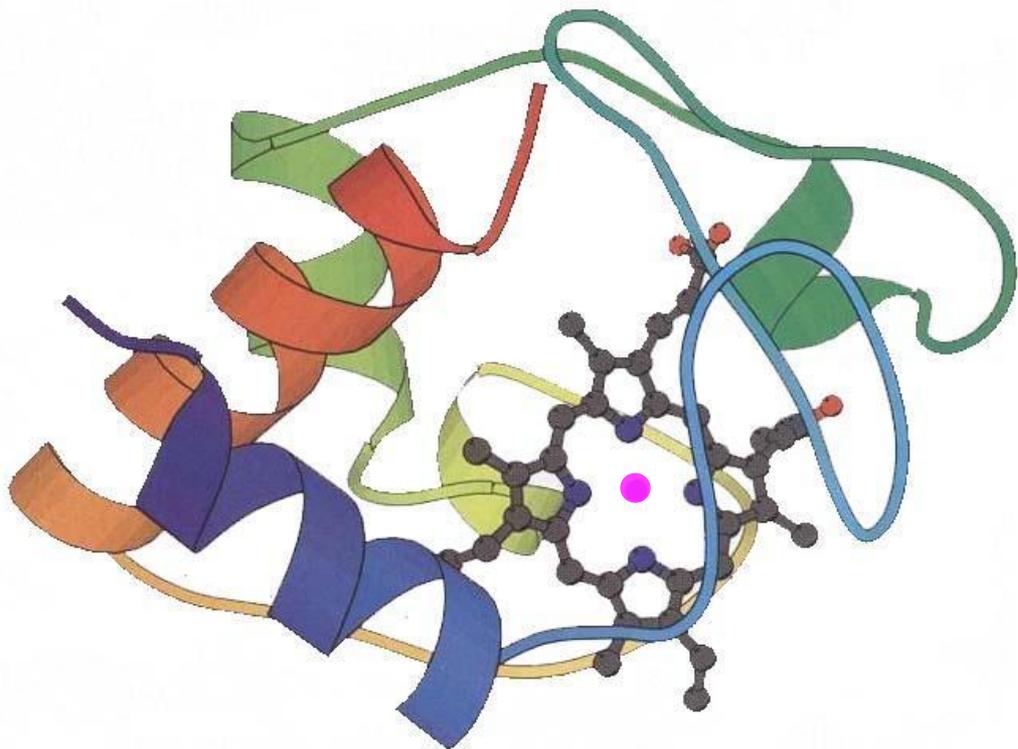
**Однократная
внутривенная
инъекция 20мг/кг
(M ± SEM, n = 6)**

**мониторинг в
течение 24 ч**

$T_{1/2} = 9.0$ ч	$C_0 = 62$ мкг/мл
$T_{max} = 2.5$ ч	$C_{max} = 260 \pm 83$ нг/мл
$Cl = 32 \pm 4$ мл/мин/кг	$V_P = 16.2$ мл/кг
$k = 0.685$	$V_C = 12.4$ мл
	$V_1 = 0.08$ мл

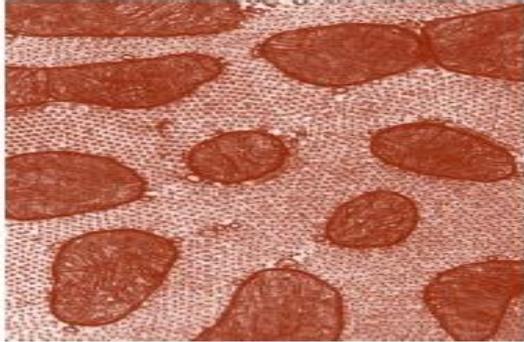
Почечная экскреция:	$28 \pm 4.3\%$
Печеночная экскреция: (метаболизм)	$16 \pm 4.0\%$
Связывание с белками плазмы:	$1.2 \pm 0.3\%$
ВКЛЮЧЕНИЕ КЛЕТКАМИ КРОВИ	
Лимфоциты:	$28.6 \pm 5.5\%$
Эритроциты:	$8.0 \pm 3.2\%$
ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ	
Миокард:	$18.4 \pm 3.40\%$
Мозг:	$0.6 \pm 0.02\%$
ВЫВЕДЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ PMS16	
С МОЧОЙ (258 ± 4.0 мкг/мл)	
Деаланилированные производные:	$56.4 \pm 8.7\%$
Деацетилированные производные:	$27.0 \pm 6.1\%$
Циклогексил- C_{60} :	$16.2 \pm 3.3\%$
Содержание PMS16 в моче:	462 ± 11 мкг/мл
Содержание C_{60} в моче:	2.9 ± 0.1 мкг/мл ₁₃

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ САЙТ ФЕРМЕНТА

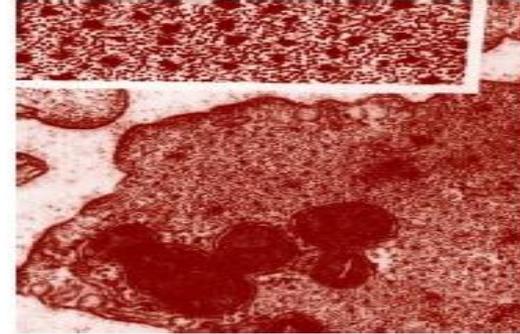


ДОКИНГ RMS16

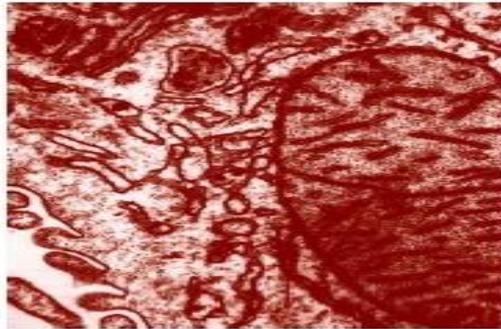
МИКРОФОТОГРАФИИ ПЕРИНУКЛЕАРНОЙ ОБЛАСТИ МИОКАРДИОЦИТОВ КРЫСЫ (ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ)



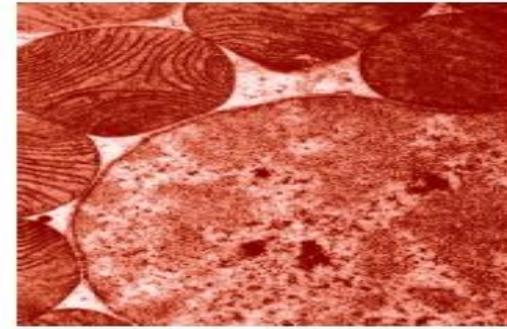
А



Б



В



Г

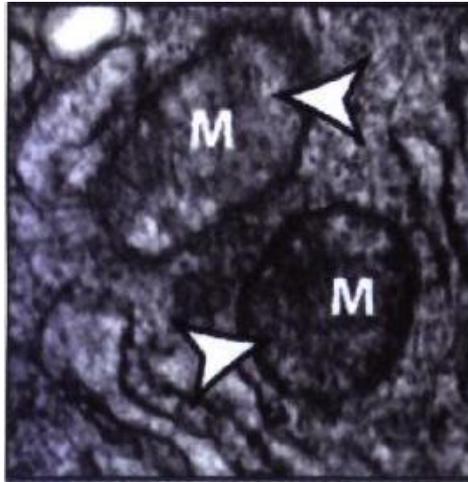
А, В – эффект предотвращения гипоксии РМС16
(30 мг/кг [^{25}Mg]РМС16, в/в → 12 ч → тест) 20 мг/кг МНА, в/в → 12 ч
→ тест)

Б – МНА-модель гипоксии (20 мг/кг МНА → 12 ч → тест)

Г – Контроль (ткань здоровой интактной крысы)

ДИСПЛАЗИЯ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДИОЦИТОВ КРОЛИКА

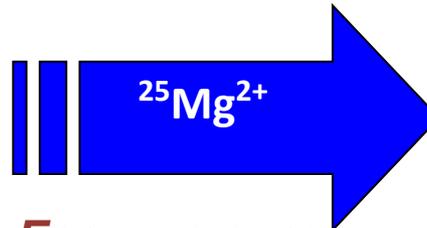
(ИНДУЦИРОВАНА ДОКСОРУБИЦИНОМ)



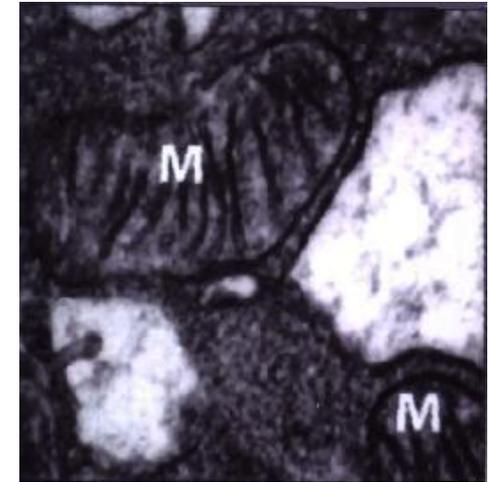
A

(A) Митохондрия (M):

0.5 DL₅₀ DXR, 12 часов



*Гранулярная
деструкция
матрикса*

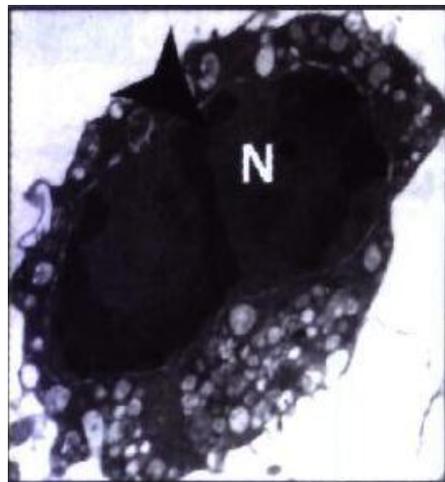


B

(B) Митохондрия (M):

0.2 DL₅₀ PMC16, 6 часов →
0.5 DL₅₀ DXR, 12 часов

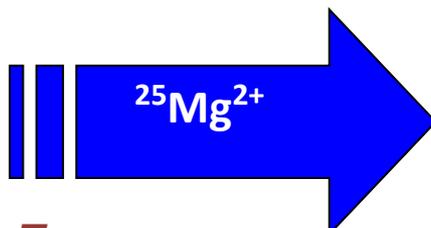
ДИСПЛАЗИЯ ЯДРА МИОКАРДИОЦИТОВ КРОЛИКА (ИНДУЦИРОВАНА ДОКСОРУБИЦИНОМ)



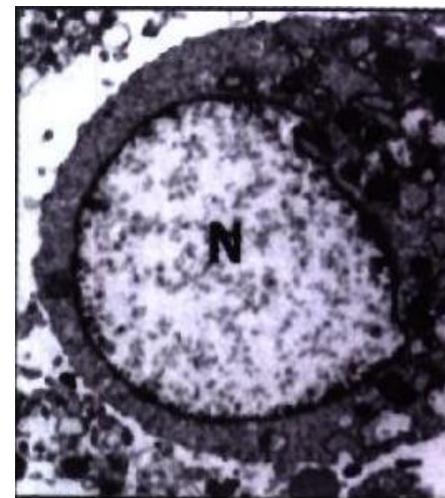
A

(A) Ядро (N):

0.5 DL₅₀ DXR, 12 часов



*Гранулярная
деструкция
матрикса*



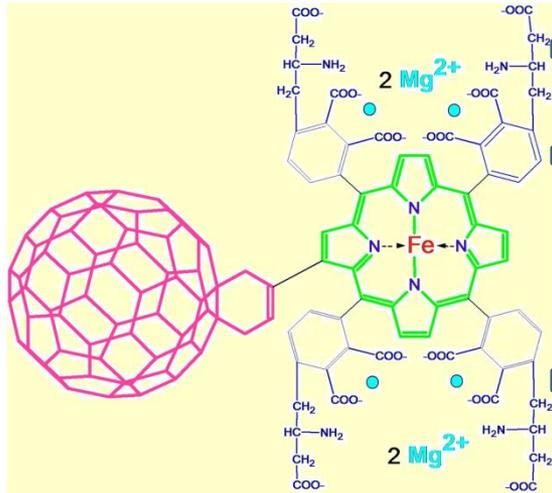
B

(B) Ядро (N):

0.2 DL₅₀ PMC16, 6 часов →
0.5 DL₅₀ DXR, 12 часов

Перспективы применения в нейробиологии «умных» нанокатионитов на основе порфириновых аддуктов фуллерена C60

Магнитные изотопные эффекты в биологии. Концепция спин-селективной биохимии (Академик РАН А.Л. Бучаченко)

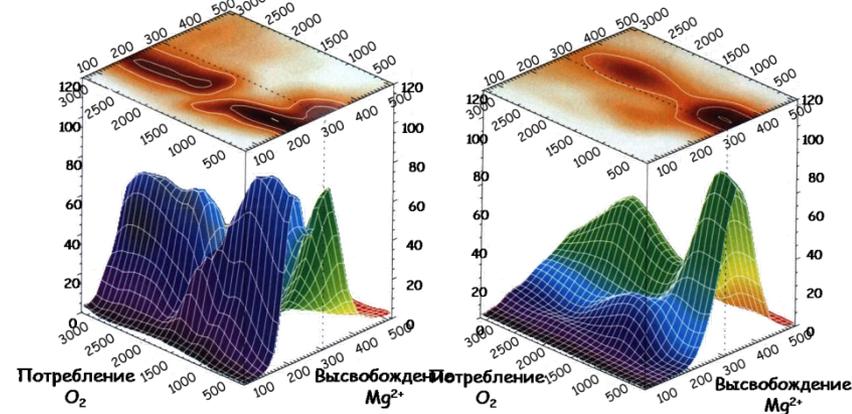


Низкая токсичность

«Умное» высвобождение ^{25}Mg в условиях ацидоза

Существенное увеличение анаэробного синтеза АТФ в условиях гипоксии

Синергизм выхода АТФ, потребления кислорода и высвобождения Mg^{2+} РМС16 в сердечной мышце крыс



Слева - Изотоп магния с нулевым спином (^{24}Mg)

Справа – Магнитный изотоп (^{25}Mg)

Порфиллерен-МС16 (РМС16)

(Проф. Д.А.Кузнецов),
6 международных патентов

Применение: профилактика и терапия острой и хронической ишемии головного мозга (Порфириновые рецепторы в большом количестве содержатся в митохондриях нейронов).

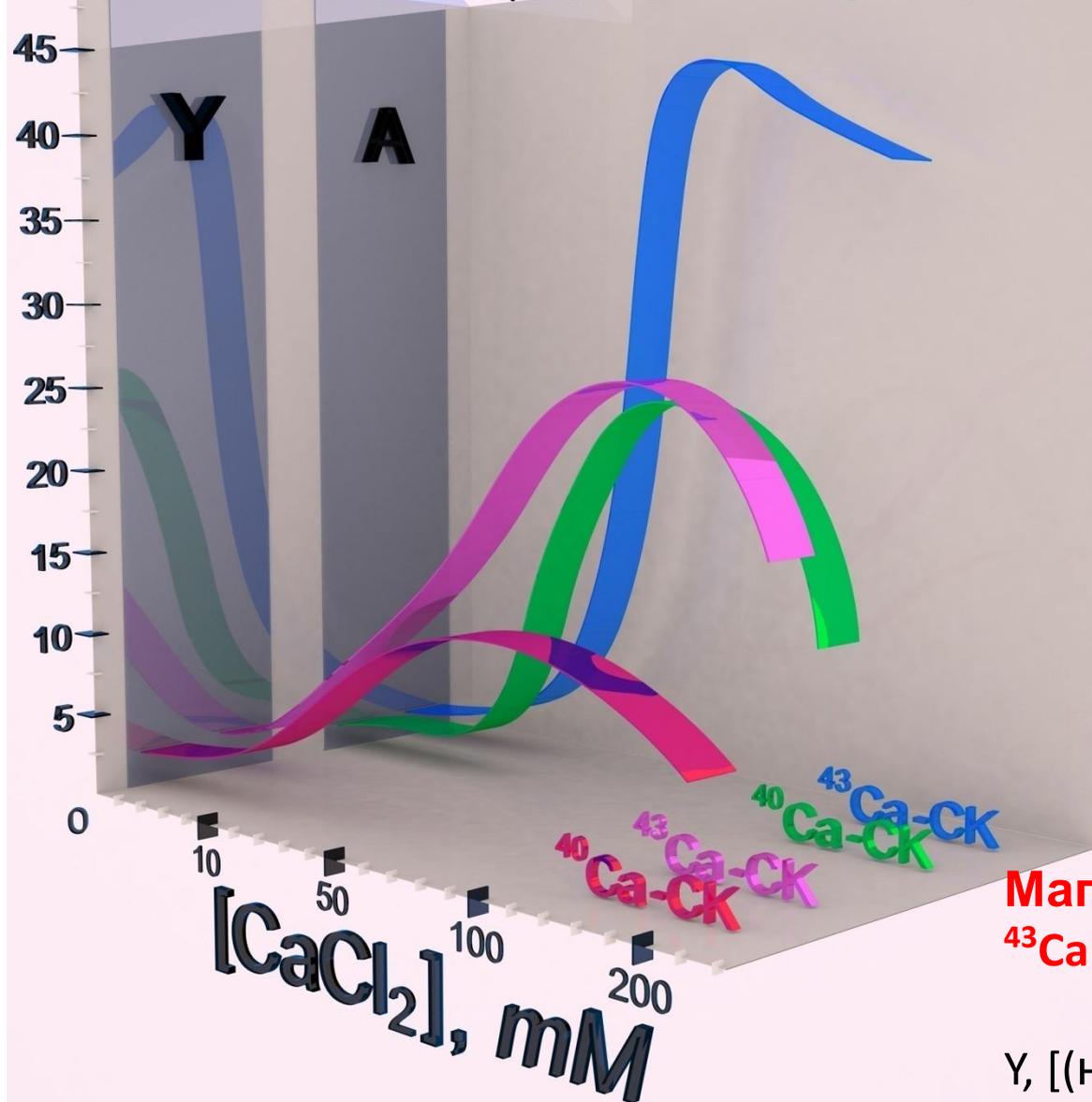
ВОЗМОЖНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ [Mg]PMS16, ПРЕДСКАЗАННЫЕ НА ОСНОВЕ ИХ СТРУКТУРЫ

ИЗВЕСТНОЕ СВОЙСТВО ДОМЕНА		ОЖИДАЕМОЕ СВОЙСТВО [Mg]PMS16, ЗАВИСЯЩЕЕ ОТ ДОМЕНА	
		ФУЛЛЕРЕН – C ₆₀	ПОРФИРИН
ГИДРОФОБНОСТЬ, ЛИПОФИЛЬНОСТЬ		МЕМБРАНОТРОПНОСТЬ	-----
ГИДРОФИЛЬНОСТЬ		-----	ВЫСОКАЯ ДЛЯ АДДУКТОВ C ₆₀ ВОДОРАСТВОРИМОСТЬ
СРОДСТВО К СИГНАЛЬНЫМ БЕЛКАМ МЕМБРАН НЕКОТОРЫХ КЛЕТОК		-----	МЕМБРАНОТРОПНОСТЬ, ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ, ВОЗМОЖНОСТЬ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ИЗОТОПОВ Mg
DL ₅₀ = 2465 мг/кг, в/в, крысы		ОТНОСИТЕЛЬНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ФАРМ. ПРИМЕНЕНИЯ	-----
ОТСУТВИЕ ВЫРАЖЕННОЙ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ		-----	БЕЗОПАСНОСТЬ ФАРМ. ПРИМЕНЕНИЯ
МЕТАБОЛИЗМ <i>In Vivo</i>	ПОЛНОЕ ОТСУТВИЕ	ВЫСОКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛИРЕНСА, ЗАЩИТА (ЭКРАНИРОВАНИЕ) ПОРФИРИНОВОГО ДОМЕНА И ЗАМЕДЛЕНИЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ НАНОЧАСТИЦЫ	-----
	ПРЕДШЕСТВЕННИК В БИОСИНТЕЗЕ ГЕМА	-----	БЕЗОПАСНОСТЬ ФАРМ. ПРИМЕНЕНИЯ, ВОВЛЕЧЕНИЕ В ЕСТЕСТВЕННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ
КАТИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА		-----	АЦИДОЗ - ИНДУЦИРУЕМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАТИОНОВ ²⁵ Mg ²⁺ ПРИ ТКАНЕВЫХ ГИПОКСИЯХ («УМНАЯ» НАНОЧАСТИЦА)

Magnetic Isotope Effect of ^{43}Ca

Y , [(nmol ATP/min)/mg CK] $\times 10^3$

A , [c.p.m. γ - ^{32}P ATP/mg CK] $\times 10^3$

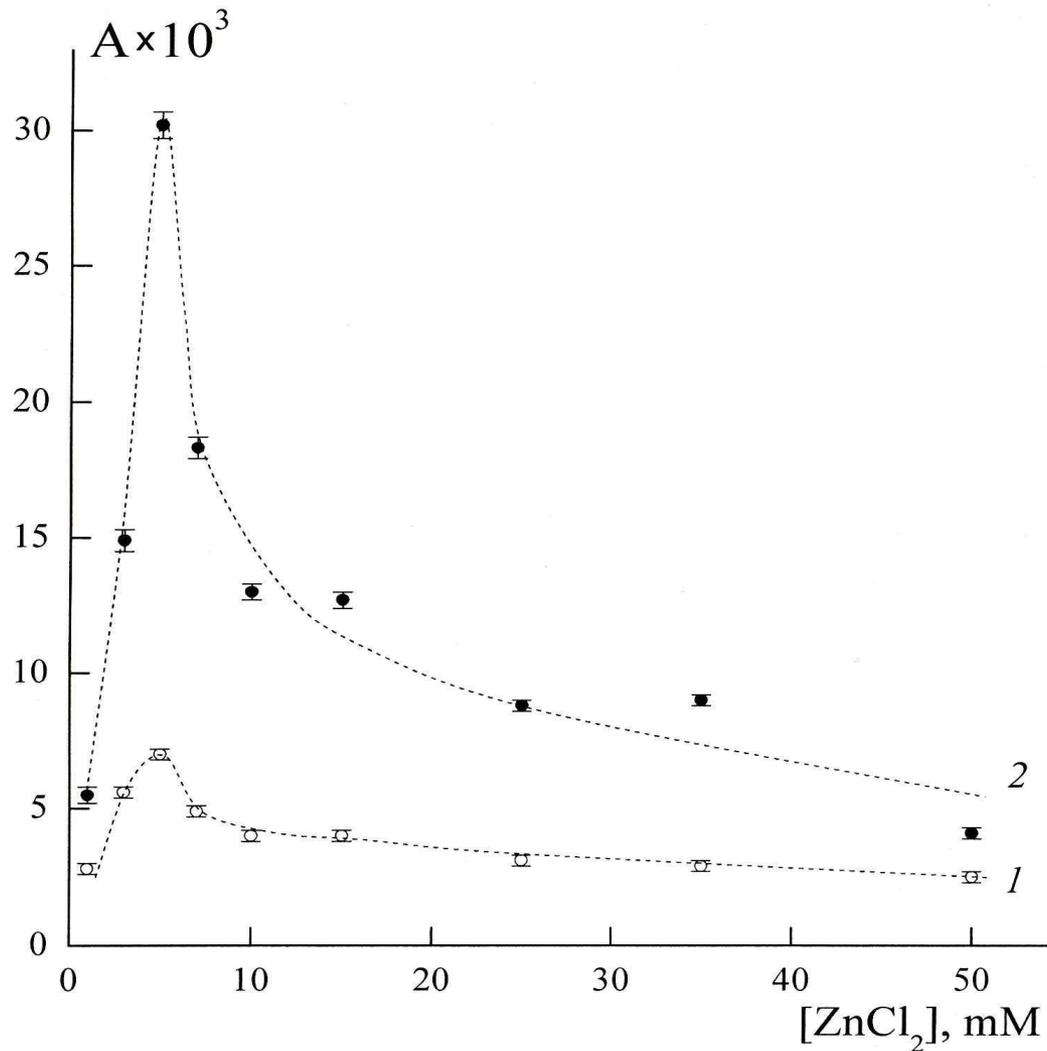


Магнитный изотопный эффект ^{43}Ca

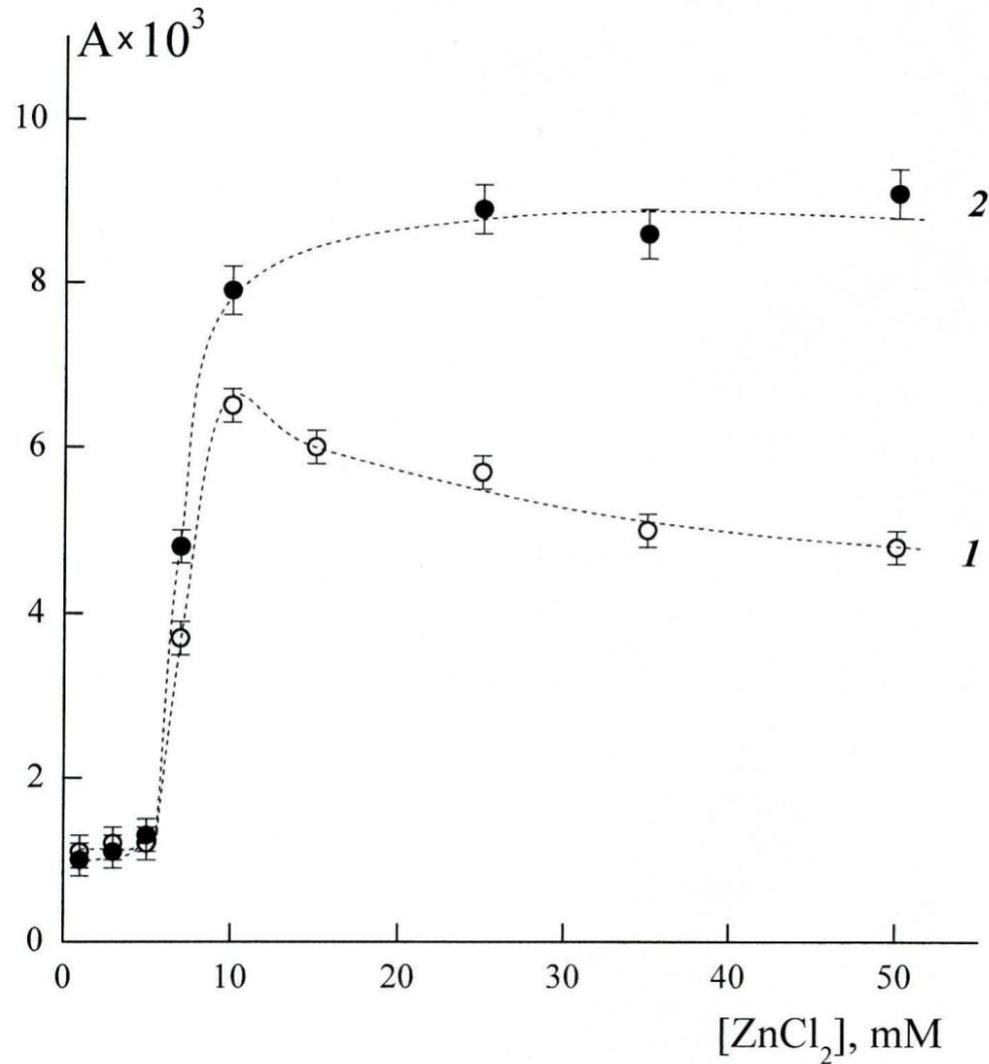
Y , [(нмоль АТФ/мин)/мг КК] $\times 10^{-3}$

A , [имп/мин γ - ^{32}P АТФ/мг КК] $\times 10^{-3}$

Zn-индуцированный синтез АТФ креатинкиназой

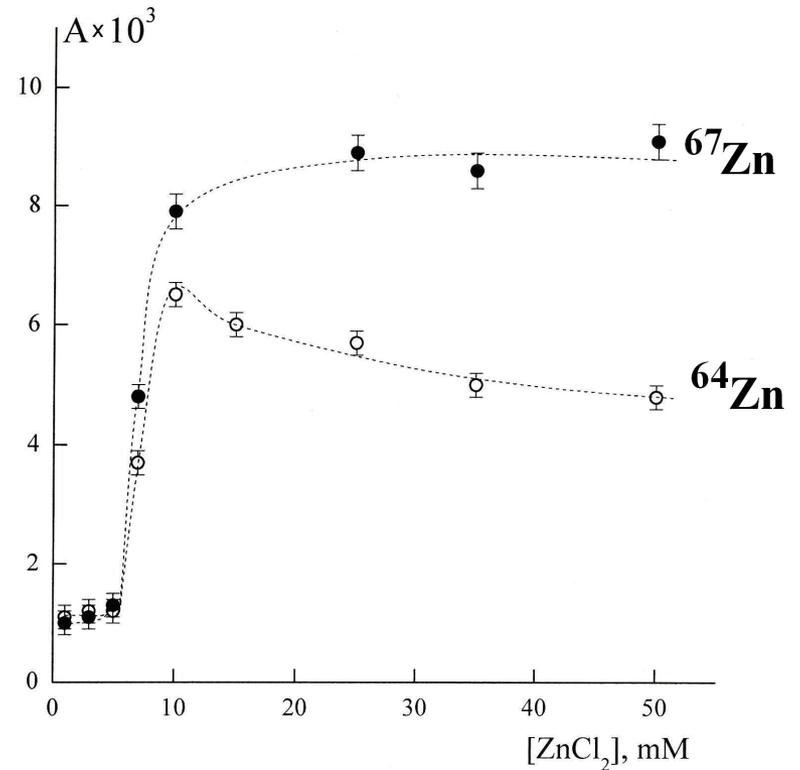
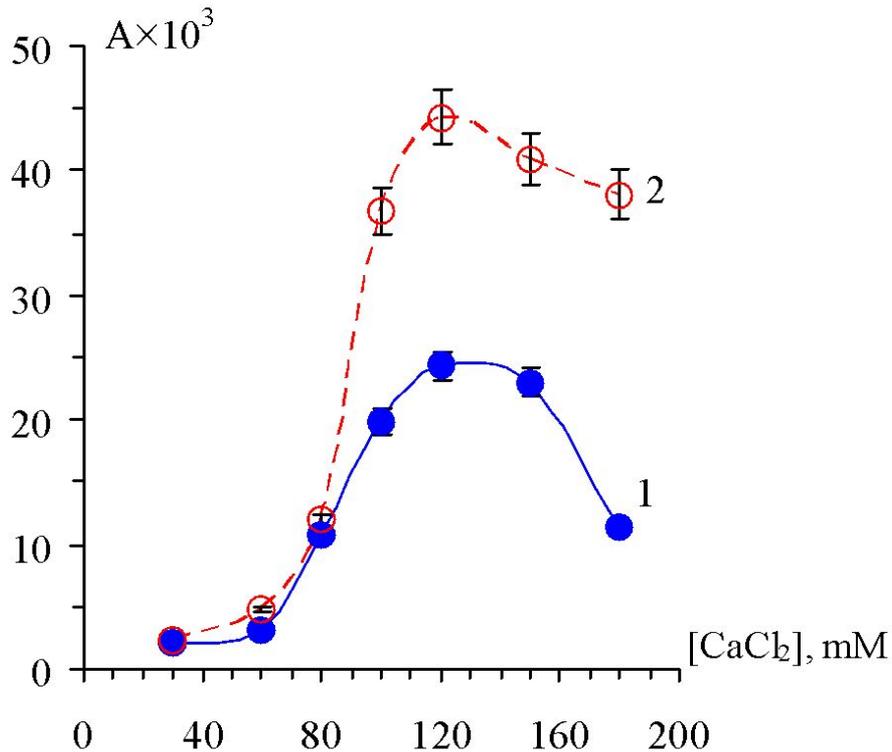


Zn-индуцированный синтез АТФ пируваткиназой

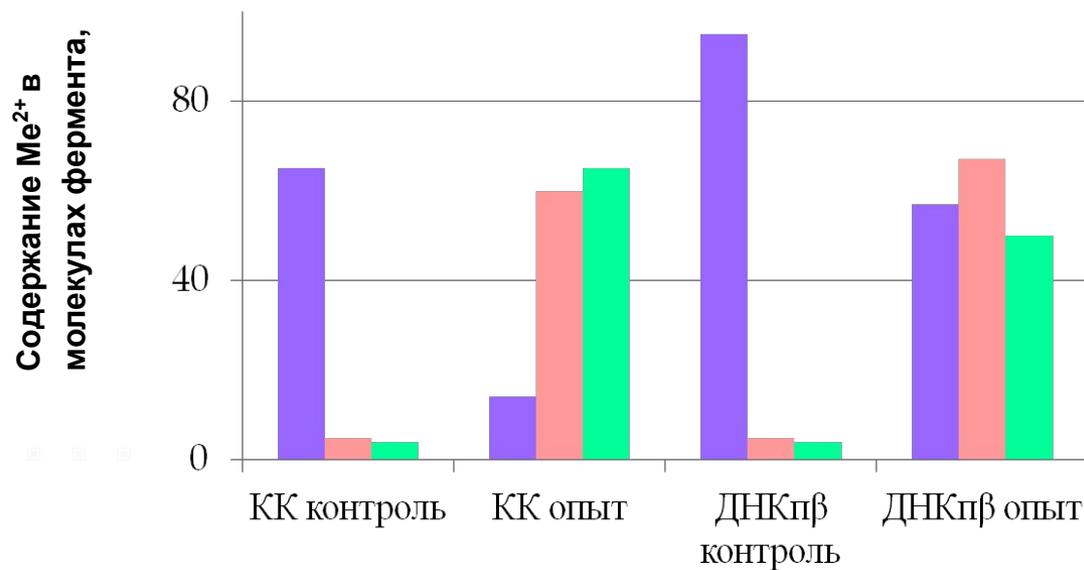


Синтез АТР креатинкиназой зависит от изотопии Са и Zn

- с немагнитными изотопами ^{40}Ca (1) и ^{64}Zn
- с магнитными изотопами ^{43}Ca (2) и ^{67}Zn



Уровень предельных величин замещения магния экзогенными ионами Ca^{2+} и Zn^{2+} в молекулах креатинкиназы и ДНК-полимеразы β



Контроль – интактный фермент
Опыт – замещение Mg^{2+} ионами Ca^{2+} или Zn^{2+}
до предельно возможного уровня

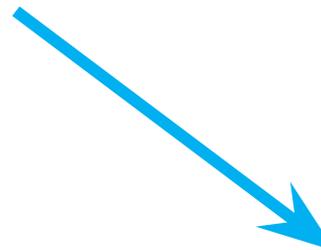
ДНКпβ – ДНК-полимераза β

■ Mg^{2+}
■ Ca^{2+}
■ Zn^{2+}

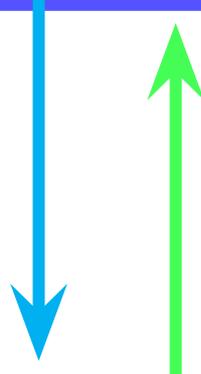
Предпосылки применения МИЭ

**МИЭ в управлении
металл – зависимым
ферментативным катализом**

*(А.Л. Бучаченко и соавт., 2005-2013;
Sarkar et al., 2007-2011; Amirshahi et al. 2008-2011)*

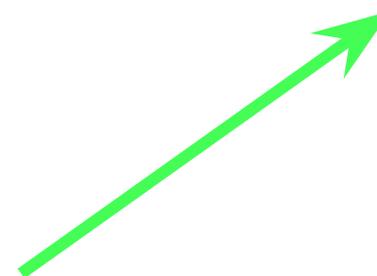


**Фармакологическое
применение
МИЭ- $^{43}\text{Ca}^{2+}$**

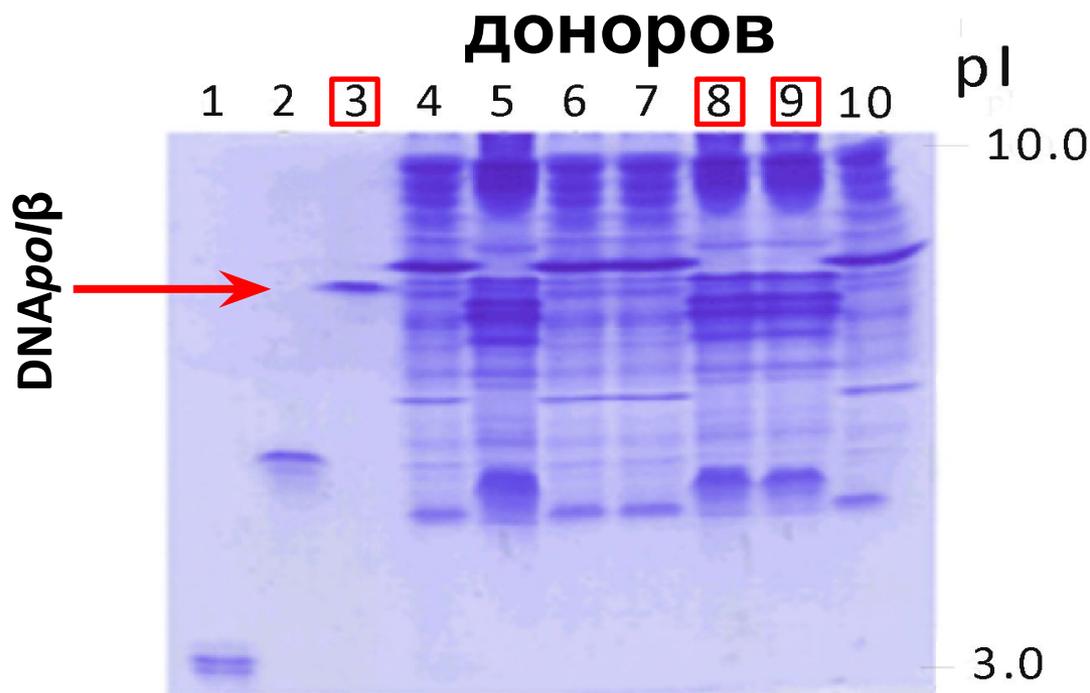


**ДНК-полимеразы β :
легитимные мишени для действия
цитостатиков**

*(М.А. Орлова и С.А. Румянцев 2012-2013;
А.Л. Бучаченко и соавт., 2013)*



Изоэлектрическое фокусирование продуктов фракционирования ядер клеток HL-60 и миелоцитов/миелобластов здоровых доноров



1 – маркер, кислый гликопротеин плазматической мемораны клеток HeLa,

2 – маркер, гистон H1A клеток HeLa,

3 - **бета – подобная ДНК-полимераза из хроматина ядер клеток HL-60,**

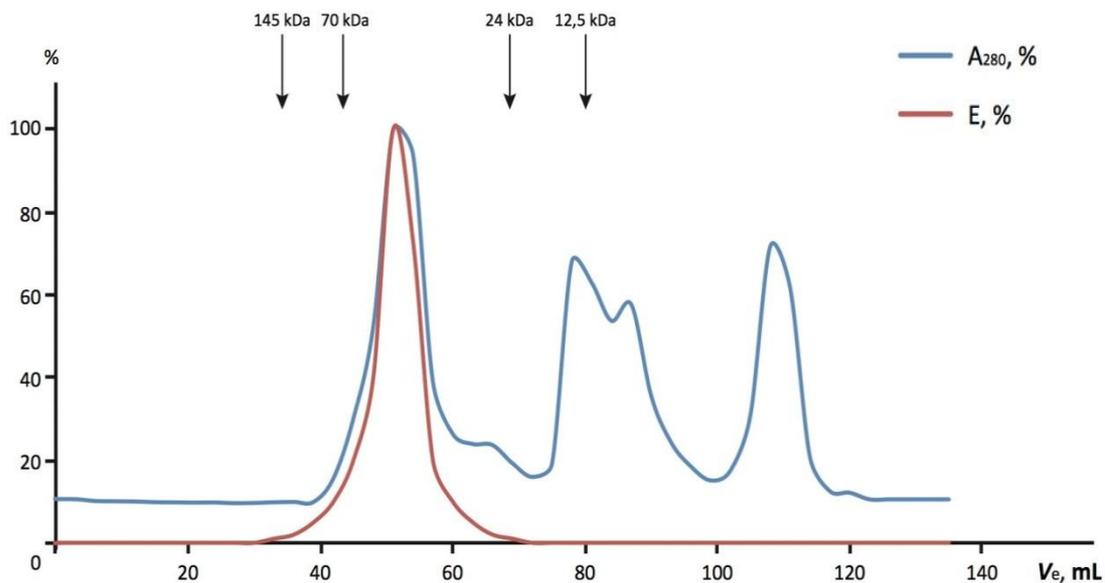
4, 6, 7 – суммарный белок хроматина ядер миелоцитов/промиелоцитов/миелобластов здоровых доноров,

5 – суммарный белок ядер клеток HL-60,

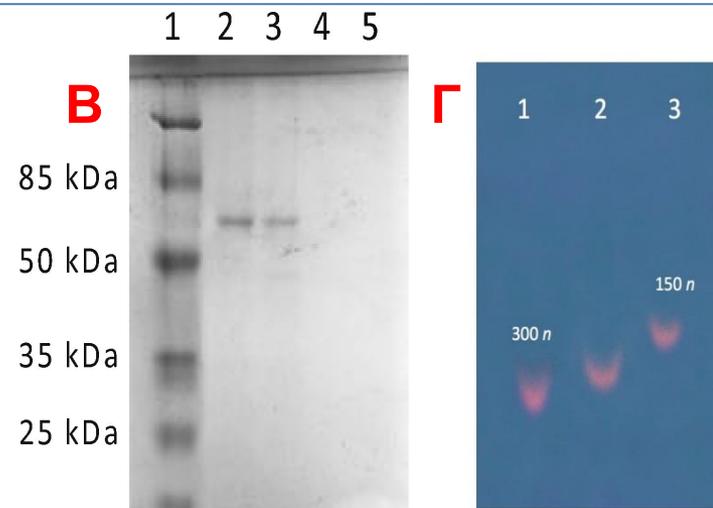
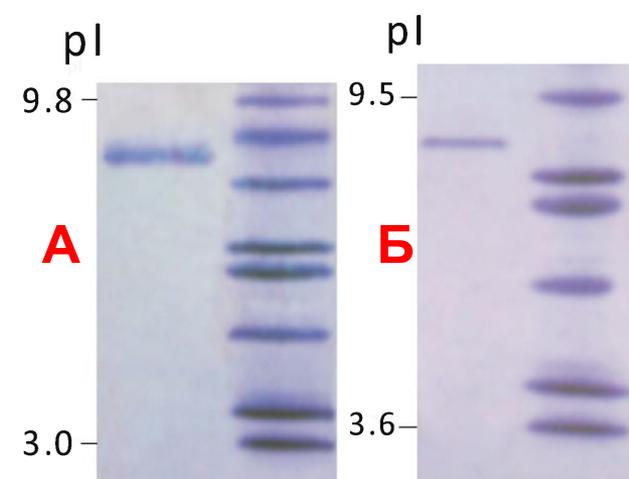
8, 9 – **суммарный белок хроматина ядер клеток HL-60,**

10 – суммарный белок нуклеоплазмы ядер клеток HL-60.

Очистка и характеристика ДНК-полимеразы β из частично фракционированного хроматина клеток HL-60



Профиль разделения белков хроматина из клеток HL-60 на колонке TOYOPEARL HW 55F и каталитической активности выделенной бета-подобной ДНК-полимеразы



A и Б - ИЭФ очищенной бета-подобной ДНК-полимеразы и коммерческих маркеров.

В - SDS – PAGE анализ: 1 – коммерческие маркеры, 2 – 5 – очищенный фермент (5,0, 1,0, 0,5 и 0,1 мкг/гель).

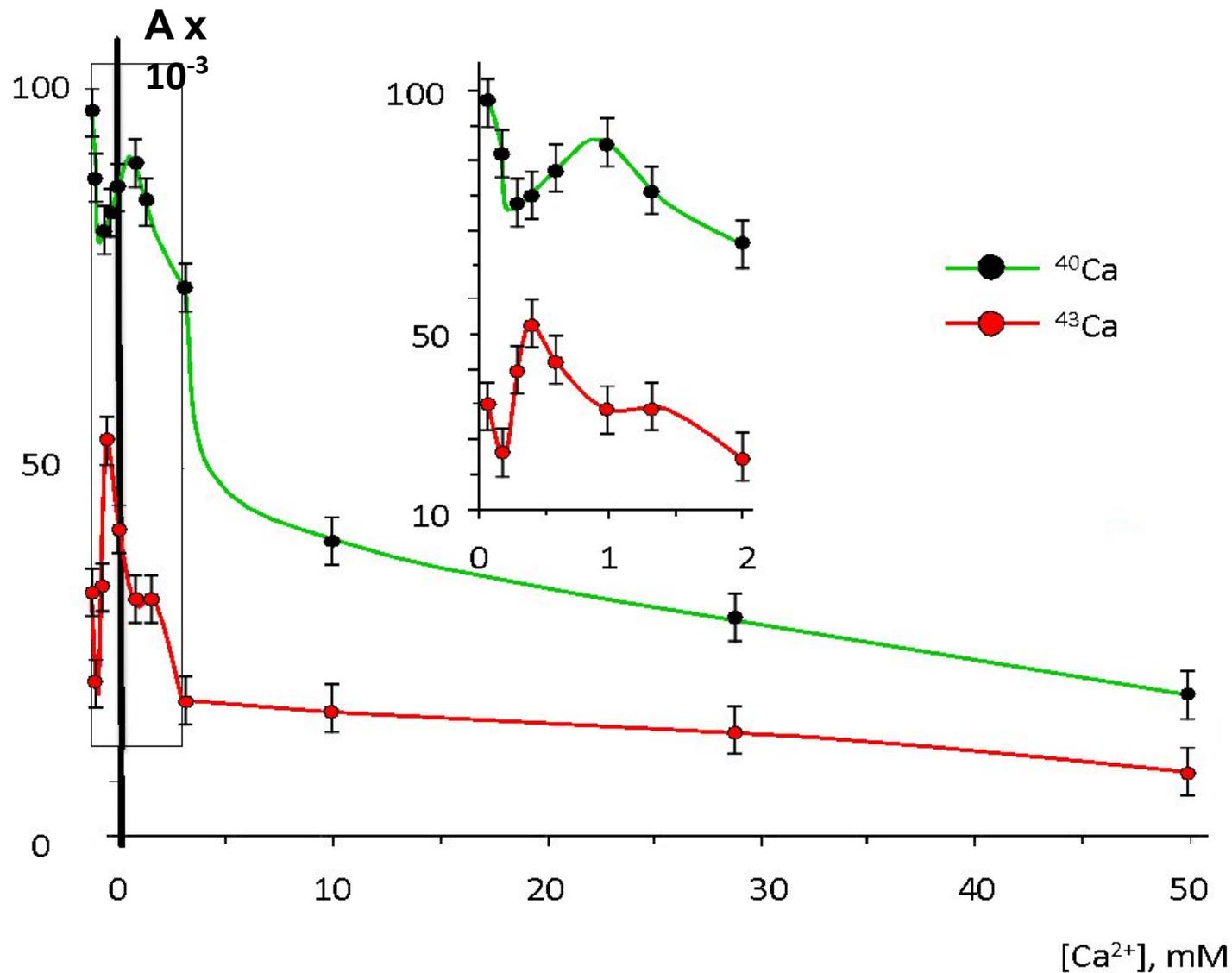
Г - Электрофорез ДНК в агарозном геле: 1, 3 – коммерческие маркеры одנותяжевой ДНК, 2 – фрагменты ДНК, процессирующие на выделенной ДНК

Идентификационные критерии ДНК-полимераз семейства β

- Молекулярная масса <110 кДа
- Низкая процессивность фермента
- Низкая продуктивность ($n < 300$)
- Mg-зависимый фермент
- Мономер
- Отсутствие 3',5'-эксонуклеазной активности
- Локализация в хроматине
- Резистентность к таким ингибиторам, как Афидиколин и *N*-этил-меламид
- ИЭТ 8.2 - 8.6
- Активация фермента при высоких концентрациях KCl (200mM)

**Каталитическая активность бета-подобной ДНК-полимеразы,
выделенной из хроматина клеток HL-60:
воздействие ингибиторов и КСl**

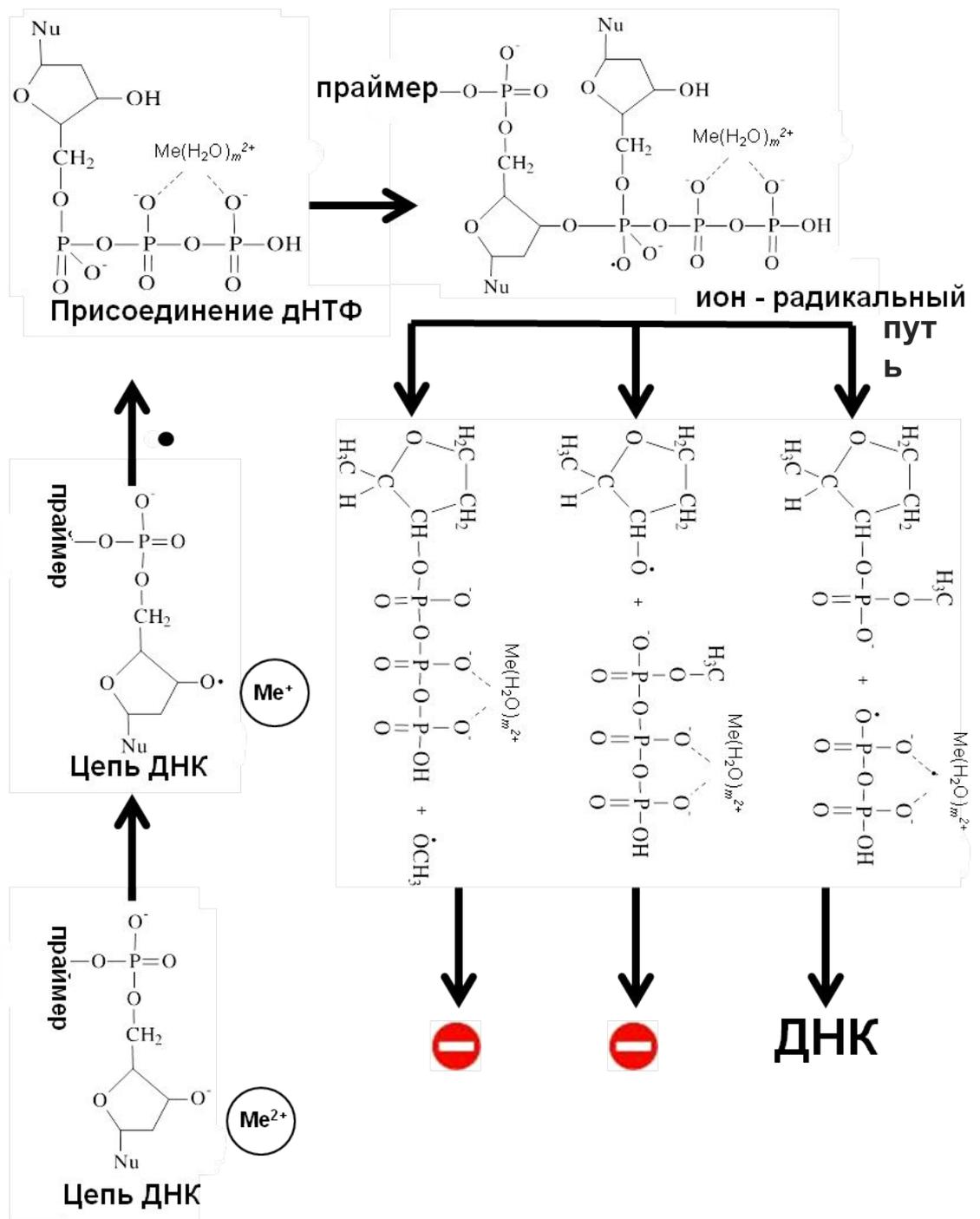
ЭФФЕКТОР	Удельная каталитическая активность ДНК-полимеразы β, (имп/мин [^3H]ДНК)/мг белка $n = 6 (M \pm m)$
Афидиколин, 5.0 мкг/мл	30 789 \pm 398
N-этилмеламид, 0.5 mM	27 632 \pm 437
ddТТФ, 2.5 мкМ	1 370 \pm 186
Трипсин, 20 мкг/мл	207 \pm 16
КСl, 200 mM	74 613 \pm 441
Без добавления реагентов (оптимальная инкубационная среда)	29 838 \pm 322



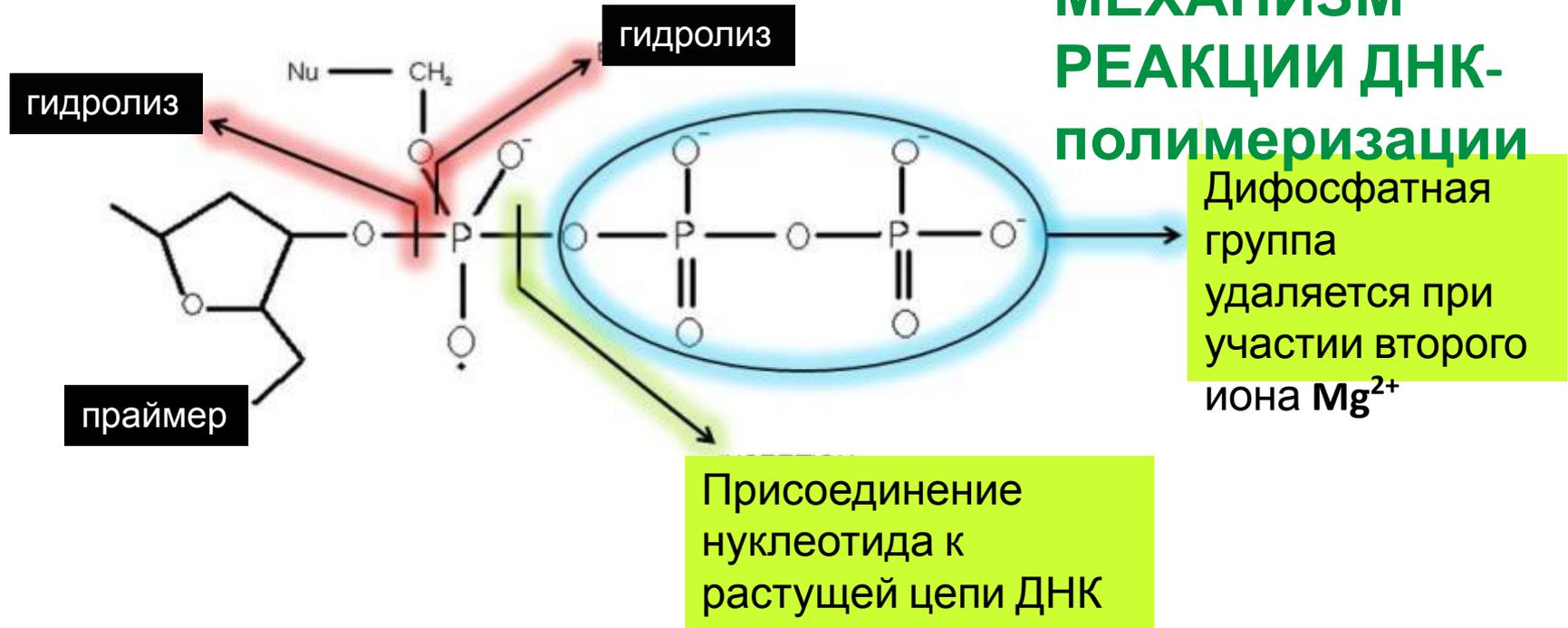
Зависимость скорости синтеза ДНК ДНК-полимеразой β из клеток HL-60 от концентраций ионов $^{40}\text{Ca}^{2+}$ и $^{43}\text{Ca}^{2+}$

A – (имп/мин [^3H]ДНК)/мг фермента

Механизм нарушения синтеза ДНК



МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ДНК- ПОЛИМЕРИЗАЦИИ



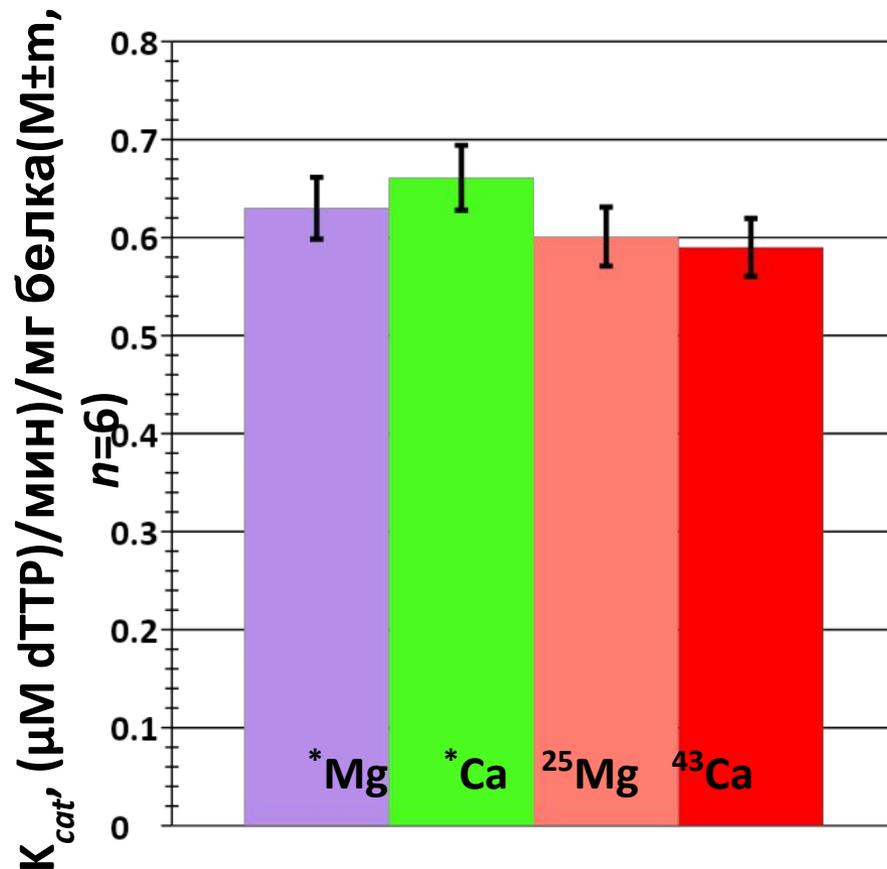
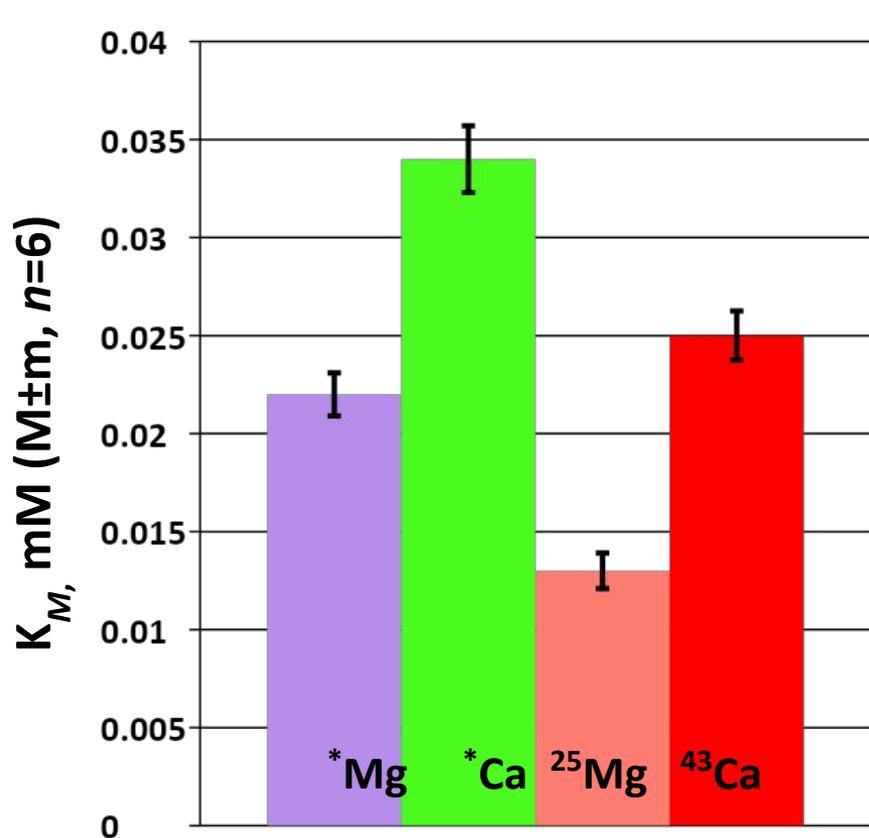
В отличие от киназ, в случае ДНК-полимераз **донором электрона** выступает **кислород рибозы**, а не фосфатной группы.

Под воздействием магнитного момента ядра изотопа $^{43}\text{Ca}^{2+}$, находящегося в **каталитическом сайте** фермента, образуется **ион-радикальная пара**.

Существуют 3 возможных варианта **разрыва связи** после присоединения нуклеотида к растущей цепи ДНК, лишь **один** из которых (-) приводит к **удлинению праймера**.

В случае **ион-радикальной пары** этот **путь подавляется**, что и приводит к уменьшению активности ДНК-полимеразы.

Влияние МИЭ - Me^{2+} на кинетику катализа, обеспечиваемого ДНК-полимеразой β из клеток HL-60 ($[Me^{2+}]_{opt} = 20 \text{ mM}$)



ВОЗДЕЙСТВИЕ ИЗОТОПИИ ИНКУБАЦИОННОЙ СМЕСИ

ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ β

НА ДЛИНУ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ



Электрофорез в 2.0%-м геле агарозы

1 - ДНК-маркеры, 110 – 489 n;

2 - 2-20 мМ $^{43}\text{CaCl}_2$, без Mg;

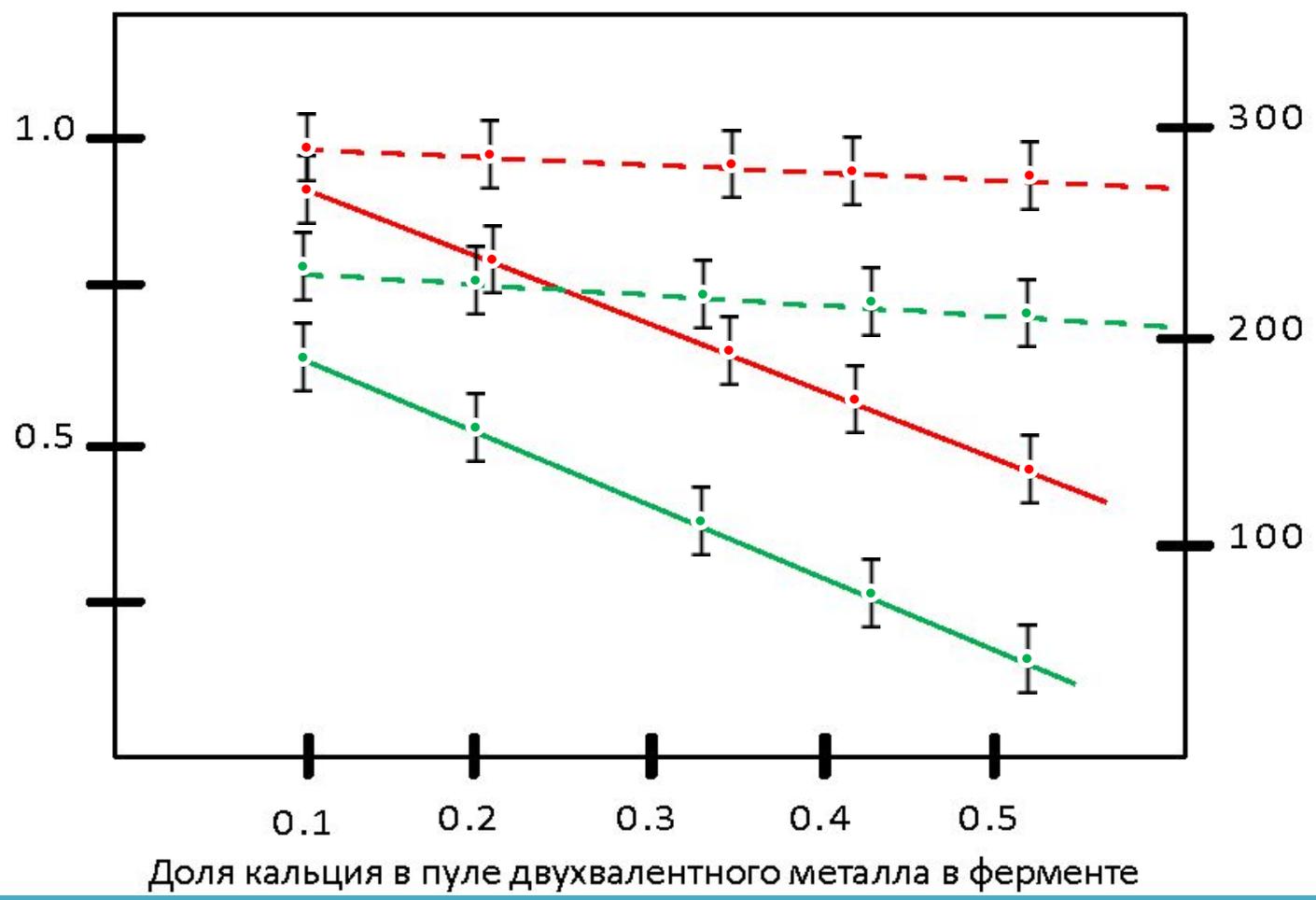
3 - 3-20 мМ $^{25}\text{MgCl}_2$, без Ca;

4 - 4-20 мМ $^{40}\text{CaCl}_2$, без Mg;

5 - 5-20 мМ $^{24}\text{MgCl}_2$, без Ca;

*Условия инкубации фермента оптимизированы:
pH 8.0, + 37 °C, 20 мМ MeCl₂, 60 мин*

Относительная активность ДНК-
(●)



Продуктивность ДНК-полимеразы β
(●)

Изменение каталитической активности ДНК-полимеразы β как проявление МИЭ $^{43}\text{Ca}^{2+}$

Контроль: замещение Mg/ ^{40}Ca (---/---);

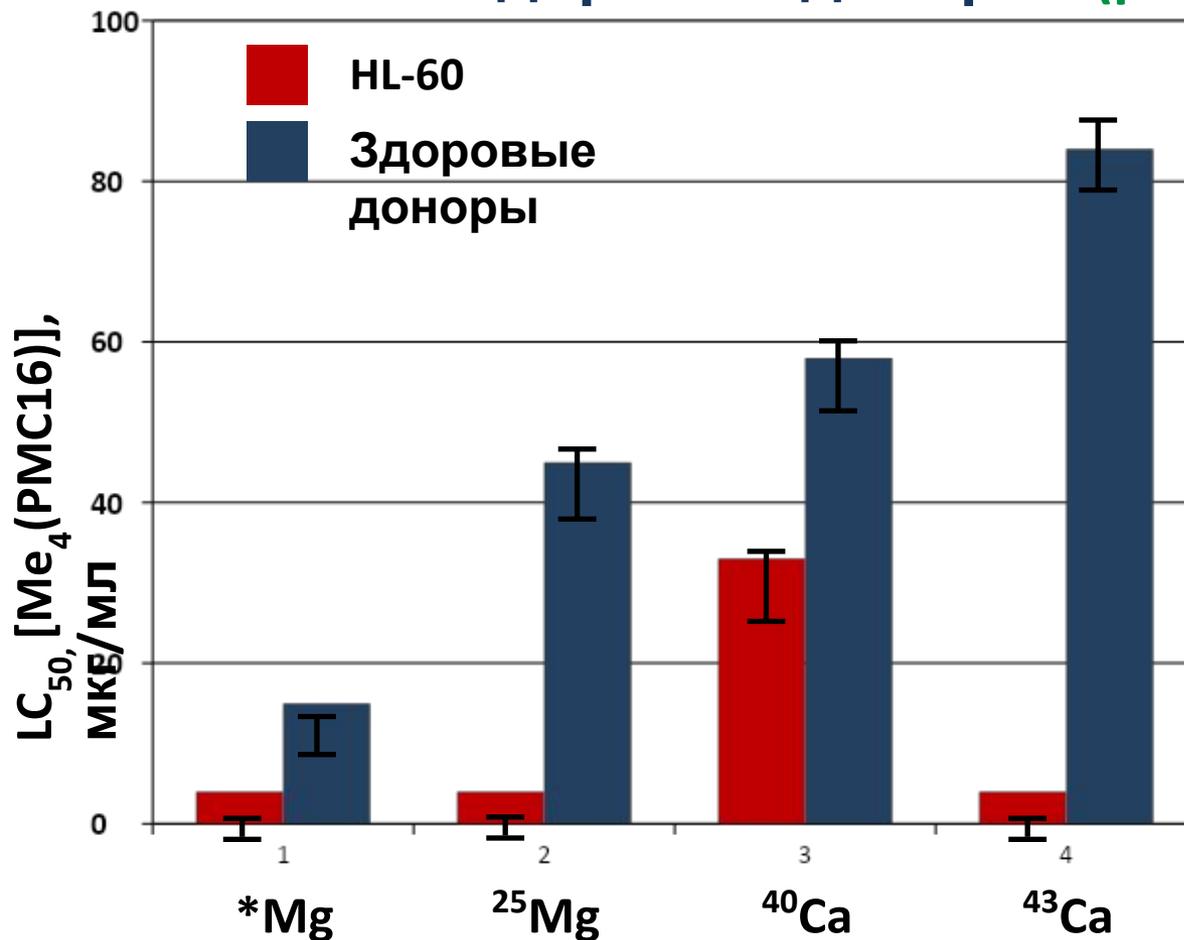
Эксперимент: замещение Mg/ ^{43}Ca (● / ●).

**ЗАВИСИМОСТЬ
ОТНОСИТЕЛЬНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
И
ПРОДУКТИВНОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ β
ОТ
ВЕЛИЧИНЫ ЗАМЕЩЕНИЯ МАГНИЯ ИЗОТОПАМИ КАЛЬЦИЯ ВО
ВНУТРИФЕРМЕНТНОМ ПУЛЕ ДВУХВАЛЕНТНОГО МЕТАЛЛА**

Доля кальция в пуле двухвалентног о металла в ферменте	Относительная каталитическая активность ДНК-полимеразы бета		Максимальный размер синтезируемых фрагментов ДНК, n	
	Замещение $Mg/^{40}Ca$	Замещение $Mg/^{43}Ca$	Замещение $Mg/^{40}Ca$	Замещение $Mg/^{43}Ca$
0,1	~0,97	~0,91	~230	~200
0,2	~0,95	~0,83	~225	~125
0,3	~0,93	~0,62	~215	~100
0,4	~0,91	~0,51	~210	~87
0,5	~0,90	~0,39	~200	~35

Влияние наночастиц PMS16, транспортирующих изотопы Mg и Ca,

на выживаемость клеток (LC_{50}) HL-60 и миелобластов здоровых доноров ($p < 0,01$)

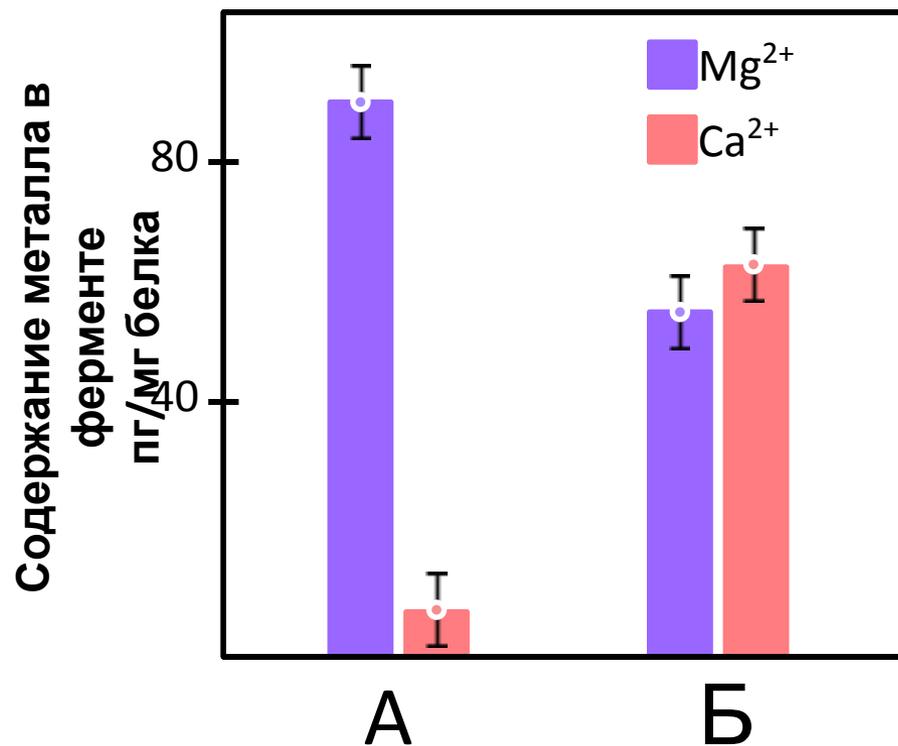


МАКСИМАЛЬНО ДОСТИЖИМЫЙ УРОВЕНЬ ЗАМЕЩЕНИЯ ЭНДОГЕННОГО Mg^{2+} КАЛЬЦИЕМ В ОЧИЩЕННОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЕ БЕТА ИЗ КЛЕТOK HL-60

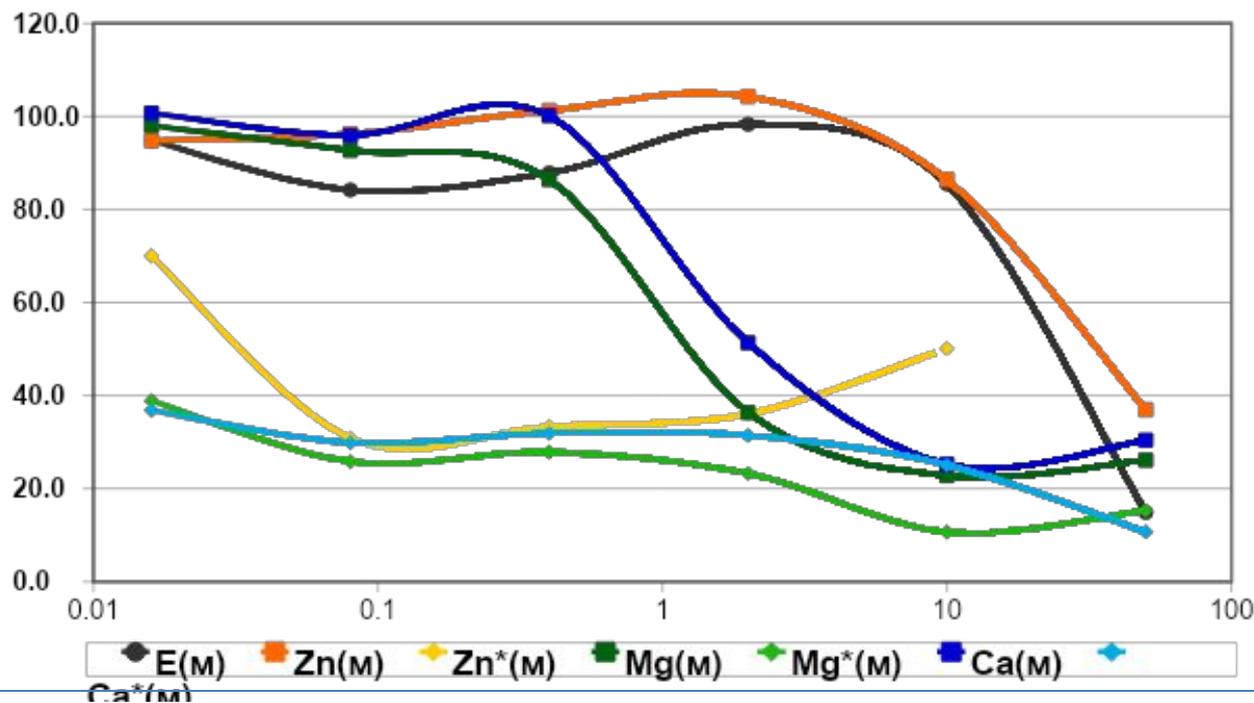
А – Контроль
(нативный фермент);

Б – Эксперимент
(Mg – Ca замещение)

20 mM $CaCl_2$ /
15 mM Трис-НСI (рН 8.0) /
1.5 mM ЭДТА /
+37°C /
2ч

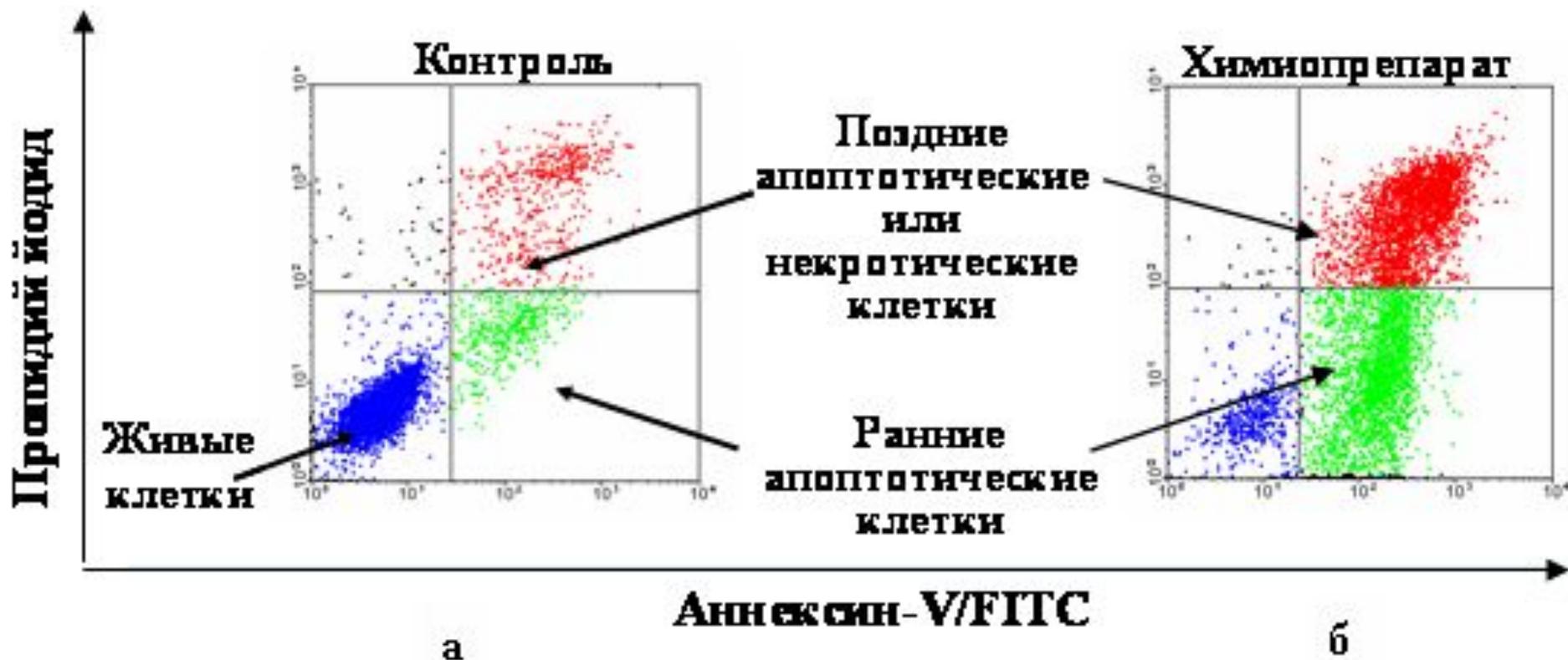


Кривые доза-эффект препаратов порфирин-фуллеренов ($\text{Me}_4[\text{PMS16}]$) для клеток линии HL60 (миелобластный лейкоз)

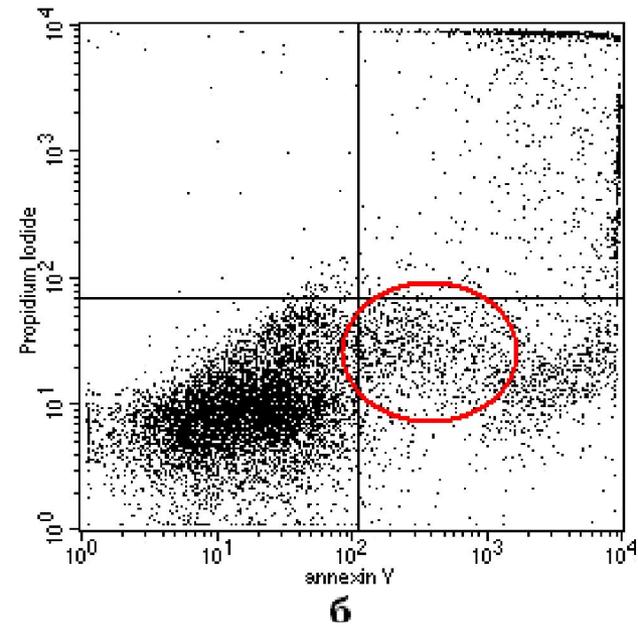
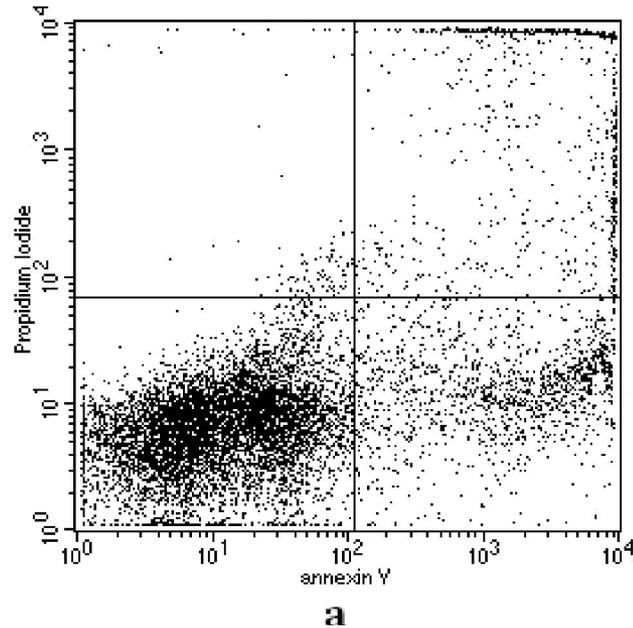


- **Цитотоксический эффект магнитных изотопов проявляется во всех исследованных концентрациях**, начиная с минимальных. Это может говорить о **высоком потенциальном противоопухолевом эффекте**, однако требуются дополнительные эксперименты, направленные на выявление потенциальных механизмов действия, механизмов гибели клетки, взаимодействия с традиционными химиопрепаратами (возможно как усиление их действия, так и цитопротекторный эффект, в первую очередь в отношении здоровых клеток).
- **Наиболее классическая кривая дозо-зависимого эффекта** в отношении бластных клеток отмечается у **немагнитных изотопов магния и кальция**, что совпадает с результатами более ранних экспериментов на клетках пациентов с ОЛЛ.

**Распределение опухолевых клеток,
окрашенных Аннексином-V/FITC и PI по
флуоресценции
после инкубации без PMS16(²⁵Mg) (а) и с PMS16(²⁵Mg)
(б)**

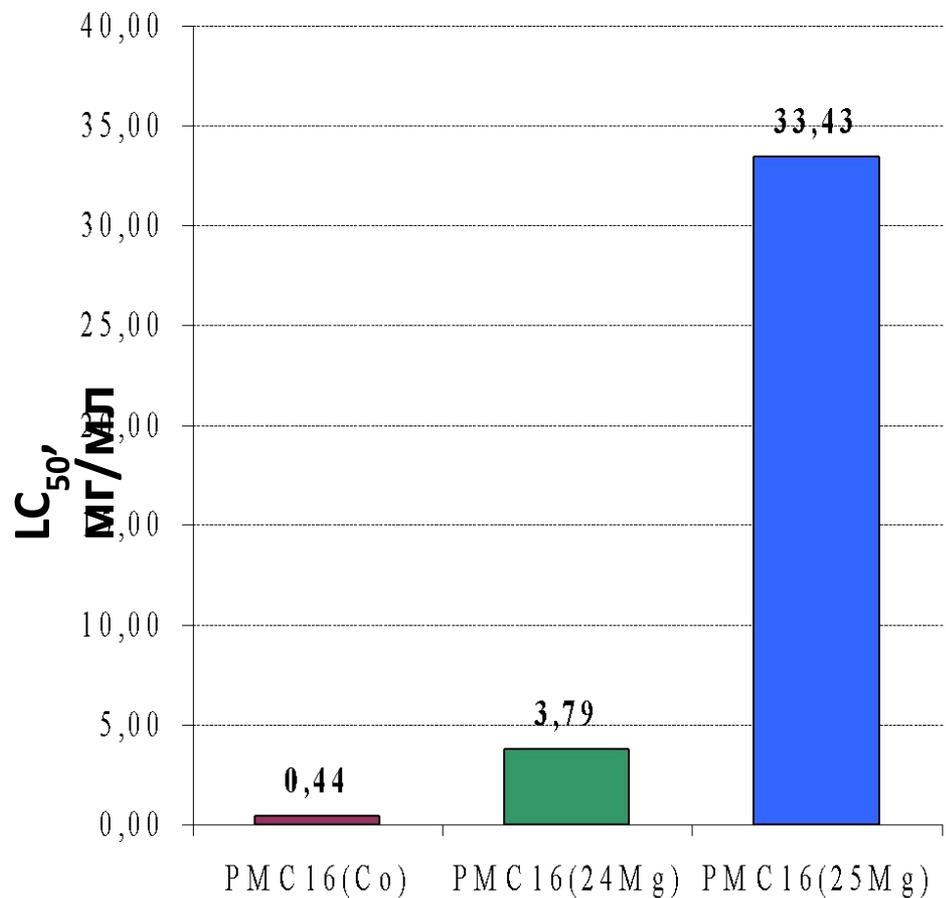


Результаты оценки индукции апоптоза



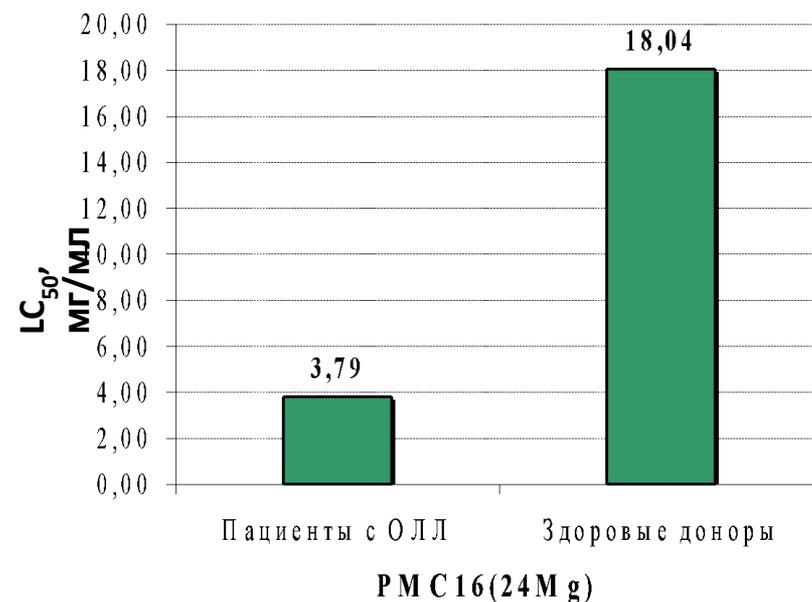
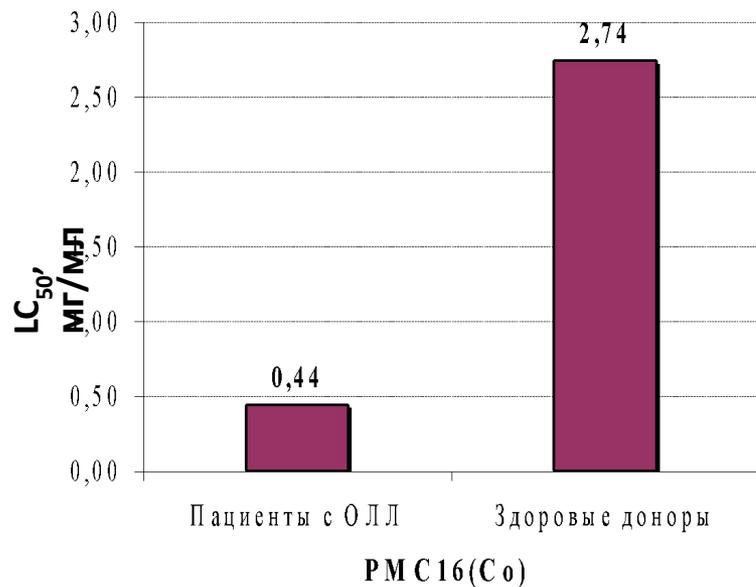
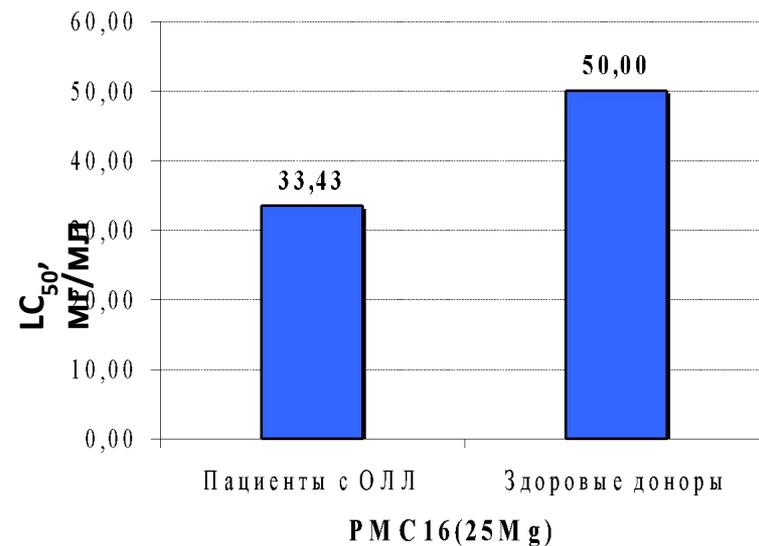
Распределение опухолевых клеток, окрашенных Annexin V/FITC/PI по флуоресценции после инкубации без препарата (а) и с препаратом (б)

Сравнение LC_{50} препаратов РМС16(Со), РМС16(^{24}Mg), РМС16(^{25}Mg), $p < 0,01$.



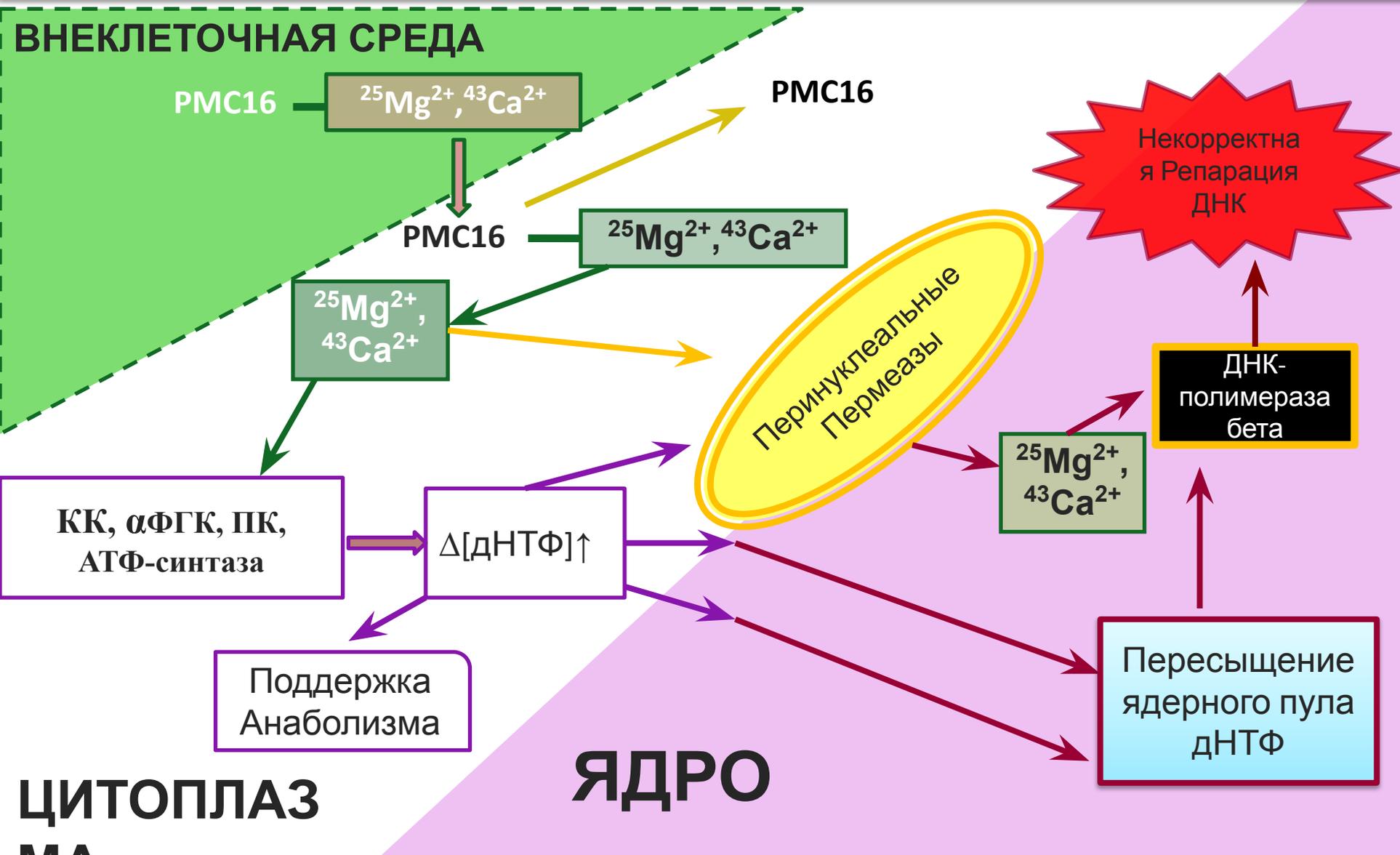
Медианы LC₅₀ препаратов

Препараты	Пациенты с ОЛЛ		Здоровые доноры		p по Mann-Whitney
	Число обследованных, n	Медиана LC ₅₀	Число обследованных, n	Медиана LC ₅₀	
PMС16(Со)	8	0,44 мг/мл	5	2,74 мг/мл	<0,01
PMС16(²⁴ Mg)	8	3,79 мг/мл	5	18,04 мг/мл	0,08
PMС16(²⁵ Mg)	8	33,43 мг/мл	5	50,00 мг/мл	<0,05



КОНЦЕПЦИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИЭ – Me^{2+} (А. Л. БУЧАЧЕНКО и соавт., 2006 – 2014)

Синергизм цитоплазматических и внутриядерных событий,
конвертирующих МИЭ ^{25}Mg и ^{43}Ca в цитостатическое воздействие на клетку опухоли



Спасибо

**Будьте здоровы и
любимы...**