

УДК 577.151.042+548.736.1:546.26-126

## ВЛИЯНИЕ КАЛИЕВОЙ СОЛИ ФУЛЛЕРЕНИЛПЕНТА-N-ДИГИДРОКСИТИРОЗИНА НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ВТОРОГО ТИПА

Ю.В. Солдатова<sup>1,2,\*</sup>, Р.А. Котельникова<sup>1</sup>, А.В. Жиленков<sup>1</sup>, И.И. Файнгольд<sup>1,2</sup>,  
П.А. Трошин<sup>1,3</sup>, М.А. Козлова<sup>2</sup>, Д.А. Арешидзе<sup>1,2</sup>, академик РАН С.М. Алдошин<sup>1</sup>

Поступило 17.06.2019 г.

Впервые получен ингибитор многоцелевого действия на мишени сахарного диабета 2-го типа на основе водорастворимого производного фуллерена C<sub>60</sub> (калиевой соли фуллеренилпента-N-дигидрокситиро- зина), который одновременно конкурентно ингибирует каталитическую активность альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы, а также проявляет антигликирующее действие на белок – бычий сывороточ- ный альбумин. Определены значения констант ингибирования ферментов.

*Ключевые слова:* водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub>, сахарный диабет второго типа, альдозо- редуктаза, сорбитолдегидрогеназа, константы ингибирования, неферментативное гликирование белков.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524883338-341>

В настоящее время сахарный диабет второго типа (СД2) является важнейшей проблемой здравоохранения в мире. По утверждению ВОЗ, сахарный диабет является одной из основных причин смертности наряду с онкологическими, сердечнососудистыми и хроническими респираторными заболеваниями [1]. В Российской Федерации число пациентов с сахарным диабетом превышает 8,5 млн человек [2], из них более чем у 90% обнаружен СД2. Сахарный диабет второго типа – это хроническое прогрессирующее метаболическое состояние, которое характеризуется гипергликемией и развивается в результате резистентности тканей организма к действию инсулина [3].

Гипергликемия при СД2 индуцирует усиление интенсивности полиольного пути метаболизма глюкозы, ферментативными мишенями которого являются альдозоредуктаза (АР) и сорбитолдегидрогеназа (СДГ). Это приводит к негативным последствиям, а именно накоплению в клетках сорбитола и фруктозы [4], НАДН/НАД<sup>+</sup> редокс-дисбалансу, истощению НАДФН, снижению уровня глутатиона, усилению окислительного стресса и развитию диабетических осложнений [5]. В связи с патологической ролью полиольного пути в развитии микро- и макрососудистых нарушений – основных причин инвалидизации и смертности больных с СД2 [2], актуальным является поиск ингибиторов СДГ и АР.

Ещё одним важным механизмом, связанным с патогенезом диабета, является неферментативное гликирование белков свободными сахарами, возрастающее при гипергликемии и вызывающее накопление конечных продуктов гликирования, нарушение структуры и функций белков [6]. Поиск ингибиторов процесса гликирования остаётся одной из важнейших задач, стоящих перед исследователями в области лечения сахарного диабета. При этом ингибиторы альдозоредуктазы, обладающие способностью ингибировать также неферментативное гликирование белков, рассматриваются как наиболее перспективные антидиабетические средства [7].

Поводом для исследования водорастворимых производных фуллерена в качестве потенциальных антидиабетических средств послужил широкий спектр полученных данных относительно их биологической активности, в частности, они обладают мембранотропными и антиоксидантными свойствами, тормозят нейродегенеративные процессы [8], а также проявляют антидиабетическое действие *in vivo* [9, 10].

В настоящей работе изучалось влияние водорастворимого пентааминокислотного производного фуллерена C<sub>60</sub> (ППФ) – калиевой соли фуллеренилпента-N-дигидрокситиро- зина (рис. 1) на ферментативные мишени СД2 альдозоредуктазу и сорбитолдегидрогеназу, а также на процесс неферментативного гликирования белка – альбумина. Производные фуллеренов данного ряда отличаются высокой растворимостью в водных и физиологических средах, низкой токсичностью, простотой получения и низкой стоимостью, а также хорошей амфифиль-

<sup>1</sup> Институт проблем химической физики Российской Академии наук, Черноголовка Московской обл.

<sup>2</sup> Московский государственный областной университет, Москва

<sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва

\* E-mail: [soldatovayv@gmail.com](mailto:soldatovayv@gmail.com)

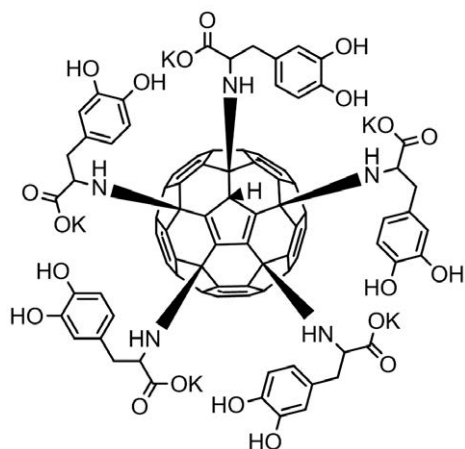


Рис. 1. Структурная формула калиевой соли фуллере-нилпента-N-дигидрокситиروزина.

ностью благодаря гидрофобным и гидрофильным фрагментам в их структуре [8].

Влияние исследуемого соединения на каталитическую активность альдозоредуктазы определяли спектрофотометрически по изменению поглощения НАДФН при 340 нм [11]. Гомогенат печени мышей получали с помощью гомогенизатора DAIHAN Scientific HG-15D и центрифуги Ohaus frontier 5515R [8]. Реакционная смесь для определения каталитической активности АР (1мл) содержала супернатант гомогената печени мышей, 1мМ D,L-глицеральдегид, 0,1 мМ НАДФН в натрий-фосфатном буфере (рН 6,2) и анализируемые соединения. Разницу в оптической плотности регистрировали в течение 5 мин (для кинетических измерений 15 мин) на спектрофотометре Agilent Cary 60.

Определение активности сорбитолдегидрогеназы сыворотки крови мышей в присутствии исследуемого соединения проводили по методу Севела–Товарека (см. [12]). Под действием данного фермента в присутствии 6 мМ НАД происходит конвертация 0,5 М D-сорбитола во фруктозу, которая при реакции с 0,1%-м резорцином даёт окрашивание, интенсивность которого определяли спектрофотометрически.

Для изучения характера ингибирования ферментов соединениями использовали кинетический метод исследования ферментативных реакций [13]. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстратов (D,L–глицеральдегида для АР и D-сорбитола для СДГ) в присутствии и в отсутствие исследуемых ППФ оценивали в обратных координатах Лайнуивера–Берка.

Антигликирующую активность соединений изучали по изменению специфической флуорес-

ценции гликозилированного альбумина при длине волны возбуждения 370 нм и максимума флуоресценции 440 нм, характерной для флуоресценции конечных продуктов гликозилирования после инкубации бычьего сывороточного альбумина 4 мг/мл с D-глюкозой в присутствии ППФ [14].

Влияние ППФ на каталитическую активность ферментов сорбитолдегидрогеназы и альдозоредуктазы в концентрации  $10^{-4}$  М представлено в таблице 1. Было показано, что данное соединение снижает каталитическую активность СДГ и АР на 59 и 60% соответственно.

Таблица 1. Влияние ППФ на исследуемые терапевтические мишени СДГ

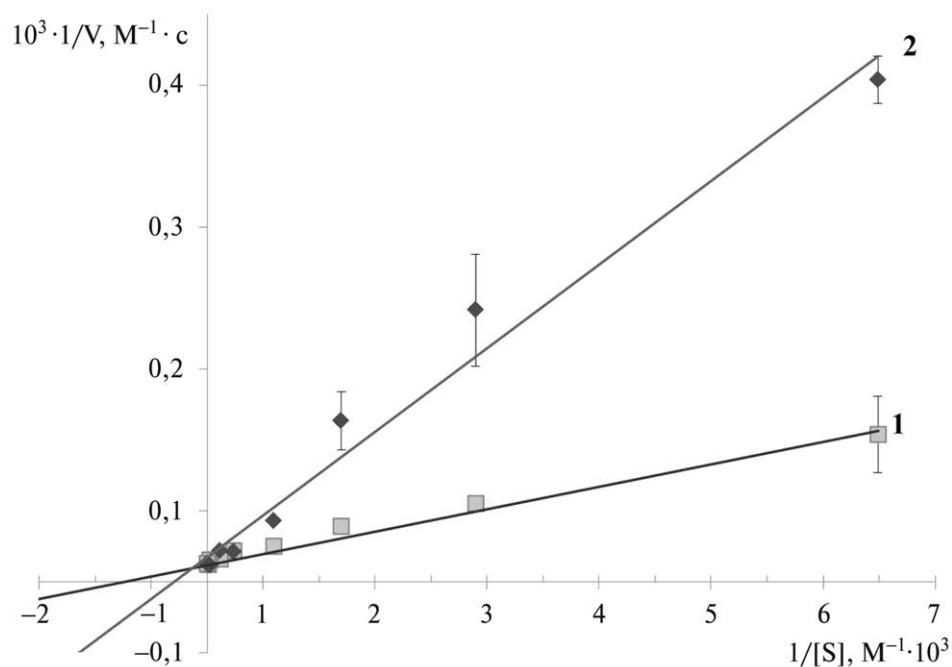
	[ППФ] = $10^{-4}$ М,		Антигликирующая активность, IC50, мкМ
	Активность СДГ, %	Активность АР, %	
Контроль	100 ± 6,3	100 ± 4,7	—
ППФ	41 ± 4,5*	40 ± 1,1*	15,1

Примечание. \* Достоверность отличий относительно контроля по t-критерию Стьюдента,  $p < 0,001$ .

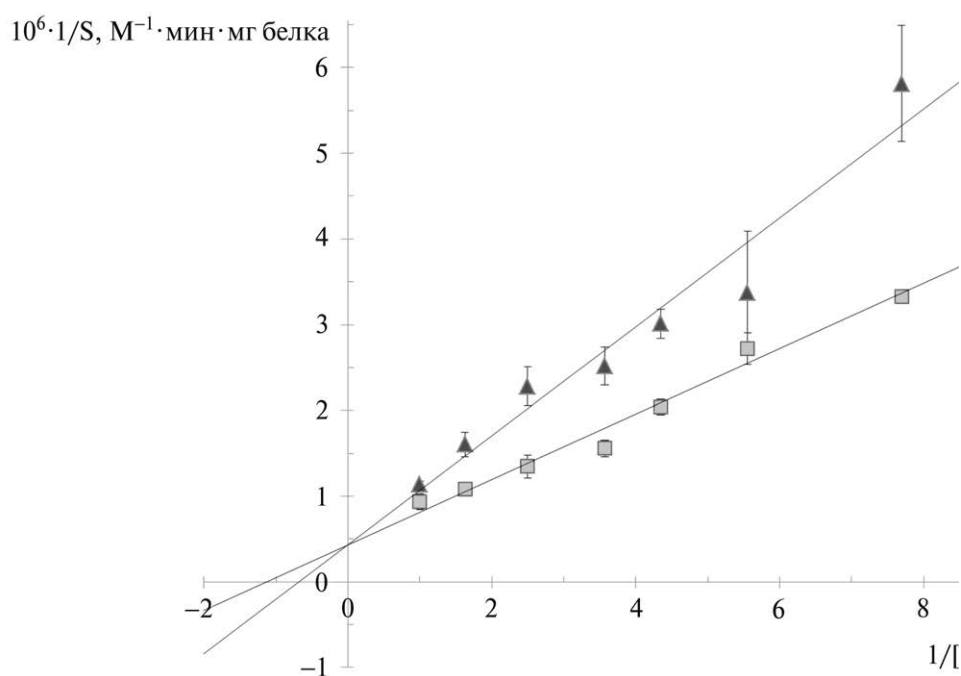
Механизм действия ППФ на каталитическую активность ферментов СДГ и АР изучали с помощью кинетического метода исследования ферментативных реакций (рис. 2, рис. 3). Как видно из рисунка 2, эта зависимость для СДГ имеет вид прямых, пересекающихся на оси ординат, что свидетельствует о конкурентном ингибировании СДГ изучаемым соединением [13]. Константа ингибирования СДГ при действии ППФ составляет  $2,92 \cdot 10^{-5}$  М. Показано, что данное соединение является конкурентным ингибитором альдозоредуктазы, поскольку прямые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в отсутствие и присутствии ингибитора пересекаются на оси ординат (рис. 3). Константа ингибирования АР при действии соединения  $K_i = 1,53 \cdot 10^{-5}$  М.

При изучении ферментативной кинетики таких известных ингибиторов альдозоредуктазы, как сорбинил, толрестат, зополрестат, поналрестат и эпалрестат, было показано [15], что АР ингибируется ими по неконкурентному механизму или по механизму смешанного типа. В данной работе установлено, что исследуемое ППФ селективно взаимодействует с АР и СДГ, так как является конкурентным ингибитором этих ферментов с константами ингибирования  $1,53 \cdot 10^{-5}$  и  $2,92 \cdot 10^{-5}$  М соответственно.

При оценке влияния ППФ на процесс неферментативного гликирования бычьего сывороточного альбумина было обнаружено, что изучаемое соеди-



**Рис. 2.** Конкурентное ингибирование каталитической активности СДГ при действии ППФ. 1 – контроль (в отсутствие ингибитора); 2 – в присутствии ППФ [ $8,33 \cdot 10^{-5}$  М]. [S] – концентрация D-сорбитола, V – скорость изменения концентрации фруктозы.



**Рис. 3.** Конкурентное ингибирование АР при действии ППФ. 1 – контроль (в отсутствие ингибитора); 2 – в присутствии ППФ [ $10^{-5}$  М]. [S] – концентрация D,L-глицеральдегида; V – скорость изменения концентрации НАДФН.

нение проявляет антигликирующую активность *in vitro*. Значение концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) для альбумина составляет 15,1 мкМ (табл. 1). При этом ППФ превышает по эффективности стандартный ингибитор гликирования аминогуанидин, для которого  $IC_{50} = 1294,4$  мкМ.

Таким образом, впервые показано, что водорастворимое производное фуллерена  $C_{60}$  (калиевой соли фуллеренилпента-N-дигидрокситирозина) проявляет мультитаргентное действие на мишени сахарного диабета второго типа: конкурентно ингибирует альдозоредуктазу и сорбитолдегидрогеназу, а также

проявляет антигликирующее действие на бычий сывороточный альбумин. Полученный результат указывает на перспективность дальнейшего изучения антидиабетического действия пентааминокислотного производного фуллерена C<sub>60</sub> – калиевой соли фуллеренилпента-N-дигидрокситиروزина in vivo с целью создания на его основе препарата для терапии сахарного диабета второго типа и его осложнений.

**Источники финансирования.** Исследования выполнены при поддержке Программы президиума РАН на 2018–2020 гг. “Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий” и по теме госзадания № 0089–2019–0014. Работы по разработке методов синтеза и получению производного фуллерена поддержаны грантом Российского научного фонда 19–13–00411.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Noncommunicable Diseases Progress Monitor. Geneva: WHO, 2017. 231 p.
2. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 8th ed. Brussels, Belgium, 2017. 147 p.
3. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva: WHO, 2016. 86 p.
4. Yan L. // Anim. Model. Exp. Med. 2018. V. 1. № 1. P. 7–13.
5. Zheng H., Wu J., Jin Z., et al. // Biochem. Insights. 2016. № 9. P. 1–9.
6. Yeh W.J., Hsia S.M., Lee W.H., et al. // J. Food Drug Anal. 2017. V. 25. № 1. P. 84–92.
7. Jagdale A.D., Bavkar L.N., More T.A., et al. // J. Diabetes Complications. 2016. V. 30. № 3. P. 398–405.
8. Патент № 2669341, РФ. Применение пентааминокислотных производных фуллеренов в качестве антиоксидантов и антидиабетических средств. Котельникова Р.А., Арешидзе Д.А., Солдатова Ю.В., и др., заявл. 6.04.2016, опубл. 10.10.2018 Бюл. № 28.
9. Hosseini A., Abdollahi M., Hassanzadeh G., et al. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2011. V. 109. № 5. P. 381–386.
10. Nedzvetskii V.S., Pryshchepa I. V., Tykhomyrov A.A., et al. // Neurophysiology. 2016. V. 48. № 2. P. 130–140.
11. Abdel Motaal A., El-Askary H., Crockett S., et al. // Phytomedicine. 2015. V. 22. № 9. P. 829–836.
12. Алексеев В.В. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Москва: ГЭОТАР-Мед, 2013. 792 с.
13. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд. Моск. ун-та, 1976. 320 с.
14. Chen Y.F., Roan H.Y., Lii C.K., et al. // J. Med. Plants Res. 2011. V. 5. № 11. P. 2322–2331.
15. Saito R., Tokita M., Uda K., et al. // Tetrahedron. 2009. V. 65. № 15. P. 3019–3026.

## POTASSIUM SALT OF FULLERENYL PENTA-N-DIHYDROXYTYROSINE EFFECTS ON TYPE 2 DIABETES MELLITUS THERAPEUTIC TARGETS

Yu. V. Soldatova<sup>1,2</sup>, R. A. Kotelnikova<sup>1</sup>, A. V. Zhilenkov<sup>1</sup>, I. I. Faingold<sup>1,2</sup>, P. A. Troshin<sup>1,3</sup>,  
M. A. Kozlova<sup>2</sup>, D. A. Areshidze<sup>1,2</sup>, Academician of the RAS S. M. Aldoshin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Region State University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

Received June 17, 2019

It was shown for the first time that pentaamino acid derivative of fullerene C<sub>60</sub> (potassium salt of fullerenylopenta-N-dihydroxytyrosine) effects on three targets of type 2 diabetes mellitus. It competitively inhibits the enzymes aldose reductase and sorbitol dehydrogenase and also exhibits antiglycation effect on bovine serum albumin. The enzymes inhibition constants were calculated.

**Keywords:** water-soluble derivatives of fullerene C<sub>60</sub>, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, inhibition constants, nonenzymatic protein glycation, type 2 diabetes mellitus.