

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ НИТРОКСИАЛКИЛСУКЦИНИМИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Л.В.Татьяненко¹, О.В.Доброхотова¹, М.А.Фадеев¹, А.Б.Еремеев¹, А.Н.Утенышев¹, В.В.Ткачев¹, Н.С.Горячев^{1,2}, А.И.Котельников^{1,2}, Б.С.Федоров¹

¹Институт проблем химической физики РАН, Московская область, Черноголовка, РФ;

²МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

Исследовано влияние на ферментативную активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭцГМФ) N-нитроксиметилсукцинимидов (1), N-(2-нитроксиэтил)сукцинимидов (2) и N-(3-нитроксипропил)сукцинимидов (3) и определена кристаллическая структура соединения 2. Все исследованные N-нитроксисукцинимиды в диапазоне концентраций от 0.1 до 0.001 мМ являются ингибиторами функции ФДЭцГМФ. При этом соединение 2 неконкурентно и обратимо тормозит гидролитическую функцию фермента с $K_i = 1.7 \times 10^{-5}$ М. Константа ингибирования N-(2-нитроксиэтил)никотинамида (препарата сравнения никорандила) составляет 3×10^{-5} М.

Ключевые слова: фосфодиэстераза цГМФ, N-нитроксиалкилсукцинимиды, ингибирование, рентгеноструктурный анализ

Всё большее внимание в медицинской химии уделяется синтезу новых противоишемических средств, в состав которых входят группировки, способные при биотрансформации генерировать монооксид азота [6,8]. Работа в этом направлении позволила нам синтезировать широкий спектр противоишемических средств с нитратными группировками [8]. Причём основным отличием этих соединений от таких препаратов, как динитро- и мононитросорбид, а также нитроглицерин, является использование в качестве носителей нитратных групп метаболически активных веществ. В работе [8] в качестве таких соединений нами были использованы нитроксиалкильные производные янтарной кислоты и их имиды. Экспериментально на крысах было показано, что некоторые из них по своей противоишемической активности находятся на уровне такого препарата, как никорандил (также содержащего в своей структуре нитратную группу), при этом два из них обладают значительно меньшей токсичностью по сравнению с никорандилом. Так, для нитроксиметилсукцинимидов, нитроксиэтил-

сукцинимидов и нитроксипропилсукцинимидов LD_{50} составляет 675, 1150 и 315 мг/кг соответственно, в то время как для никорандила — 470 мг/кг.

Проявление противоишемической активности этих соединений можно связать с наличием в их структуре нитрогруппировок, в результате чего при их биотрансформации в живом организме происходит выделение NO и активация гуанилатциклазы, что, в свою очередь, приводит к повышению уровня содержания цГМФ и, как следствие, к релаксации тонуса кровеносных сосудов. Известно также, что ингибирование активности фосфодиэстеразы цГМФ (ФДЭцГМФ) тоже ведёт к повышению уровня содержания цГМФ в организме, вызывая вазодилататорный, антигипертензивный и антиагрегационный эффект в живых организмах [3,4]. Таким образом, влияние новых биологически активных соединений на активность ФДЭцГМФ может быть использовано при создании эффективных соединений противоишемического действия.

Цель данной работы — исследовать влияние N-нитроксиметилсукцинимидов (1), N-(2-нитроксиэтил)сукцинимидов (2) и N-(3-нитроксипропил)сукцинимидов (3) (рис. 1) на ферментативную актив-

ность ФДЭЦГМФ и определить кристаллическую структуру наиболее эффективного соединения. В качестве препаратов сравнения использовали никорандил (5) — известное соединение противошемического действия, имеющее гетероциклическую структуру и нитратную группу, и теofilлин (6) — известный ингибитор ФДЭЦГМФ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали цГМФ, нуклеотидазу (якобы) (Sigma), трис-HCl, молибдат аммония ("Реахим") после дополнительной очистки. Фермент ФДЭЦГМФ выделяли из коры головного мозга крыс Вистар по известной методике [5]. Удельная активность фермента составляла 7 мкМ P_i/мг белка в мин. При определении активности ФДЭЦГМФ количество неорганического фосфата, накапливающегося в процессе ферментативной реакции, определяли методом спектроскопии при $\lambda=735$ нм с использованием спектрофотометра Specord-M-40 (Carl Zeiss) [5].

Обратимость ингибирования определяли путём диализа раствора фермента ФДЭЦГМФ, содержащего исследуемые химические соединения в концентрации 0.1 мМ. Диализ проводили против 200 мл 0.02 М трис-HCl буфера в течение 24 ч при 4-5°C в отсутствие исследованных соединений.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [1]. Кинетику ингибирования ФДЭЦГМФ исследовали по зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (цГМФ) без и в присутствии соединения 2 в концентрации 0.05 мМ [2].

При проведении рентгеноструктурного исследования соединения 2 использовали прозрачные монокристаллы C₆H₈N₂O₅ (M=188.14), параметры элементарной ячейки кристалла орторомбические: $a=18.208(3)$, $b=7.465(1)$, $c=11.811(2)$ Å, $V=1605.3(2)$ Å³, $Z=8$, $\rho(\text{выч.})=1.557$ г/см³, $\mu(\text{MoK}\alpha)=0.137$ мм⁻¹, пространственная группа Pna2(1). Структура расшифрована прямым методом и уточнена полнома-
тричным методом наименьших квадратов (МНК) по

F² по программе SHELXTL в анизотропном приближении для неводородных атомов [9]. Все расчёты выполнены по стандартным методикам программы SHELXTL [9]. Значения всех параметров, которые выдаются в экспериментальной части рентгеноструктурного анализа (PCA), являются результатом работы этой программы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе [8] строение нитроксиалкилсукцинимидов изучали методами элементного анализа и ПМР-спектроскопии. В данном исследовании строение соединения 2 изучалось с помощью PCA. В результате было обнаружено, что молекула соединения в структуре кристалла представляет собой пяти-членный азотсодержащий гетероцикл в конформации твист (рис. 2).

Выходы атомов C(3) и N(5) из плоскости C(1), C(2), C(4) составляют, соответственно, 0.08 и -0.09 Å. Карбонильные атомы кислорода не участвуют в образовании водородных связей, и длины связей C(1)=O(10) и C(4)=O(11) имеют значения 1.20(2) Å. Атомы кислорода нитрогруппы участвуют в образовании слабых межмолекулярных водородных связей типа COH с атомами водорода соседних молекул. Длины связей N(9)=O(12) и N(9)=O(13) равны 1.19(2) и 1.24(2) Å соответственно.

Исследование влияния соединений 1, 2 и 3 на ферментативную активность ФДЭЦГМФ показало, что данные соединения тормозят функцию ФДЭЦГМФ по аналогии с препаратами сравнения никорандилом (5) (таблетированная форма; "Технолог") и теofilлином (6) (Sigma-Aldrich) в концентрациях 0.1, 0.01 и 0.001 мМ (табл. 1). Соединения 1, 2, 3, 5 и 6 на 59±6, 78±7, 49±4, 54±5 и 83±8% тормозят функцию фермента в концентрации 0.1 мМ. Влияние соединения 2 на активность ФДЭЦГМФ достоверно превышает таковое препарата сравнения никорандила (5) во всех исследованных концентрациях ($p<0.05$) и соизмеримо с препаратом сравнения теofilлином (6). IC₅₀ соединения 2 равна 4.8×10^{-6} М, а никорандила и теofilлина — 4.2×10^{-6} и 9.6×10^{-6} М

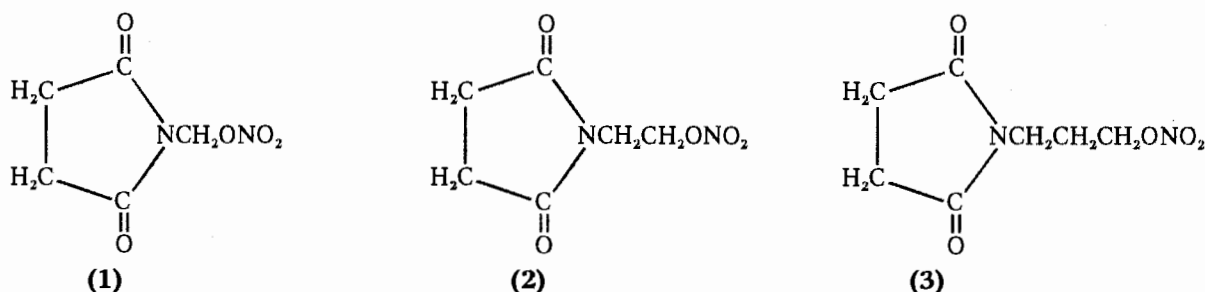


Рис. 1. Структурные формулы N-нитроксиметилсукцинимида (1), N-(2-нитроксиэтил)сукцинимида (2) и N-(3-нитроксипропил)сукцинимида (3).

соответственно. Соединение **1** действует на фермент аналогично никорандилу, ингибирующее действие соединения **3** выражено слабее (табл. 1). Сам же сукцинимид (**4**) не влияет на активность ФДЭЦГМФ.

Соединения **1, 2, 3, 5** и **6** обратимо воздействуют на функцию фермента (табл. 2). После диализа они полностью прекращают ингибирование ФДЭЦГМФ, что указывает на нековалентное связывание этих соединений с ферментом.

Более полное представление о механизме действия соединений на фермент дает кинетический метод исследования ферментативных реакций, позволяющий судить о характере связывания фермента с ингибитором [2]. Соединения **2** и **5** неконкурентно тормозят гидролитическую функцию с константой ингибирования $K_i = (1.7 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ М (**2**) и $K_i = (3 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ М (**5**) (рис. 3). Это свидетельствует о том, что соединения **2** и **5** не связываются с активным центром фермента, при этом эффектив-

ность ингибирования соединением **2** практически в 2 раза больше, чем никорандилом.

Противоишемическая активность синтезированных соединений определялась нами ранее [8] по методу [7] на крысах с экспериментальным инфарктом миокарда. Отношение размера зоны некроза к размеру зоны ишемии при использовании соединения **1, 2, 3** составляет 44.3 ± 6.7 , 42.2 ± 6.6 , 45.7 ± 5.3 соответственно, что близко к противоишемической активности никорандила (42.2 ± 5.7). Но соединения **1** и **2** выгодно отличаются от никорандила по токсическим свойствам. Так, если для никорандила LD_{50} составляет 470 мг/кг, то LD_{50} соединения **2** и **3** на уровне 1150, 675 мг/кг.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что из исследованных соединений **1, 2** и **3** в отношении ингибирования каталитической активности ФДЭЦГМФ наиболее активно соединение **2**, которое неконкурентно и об-

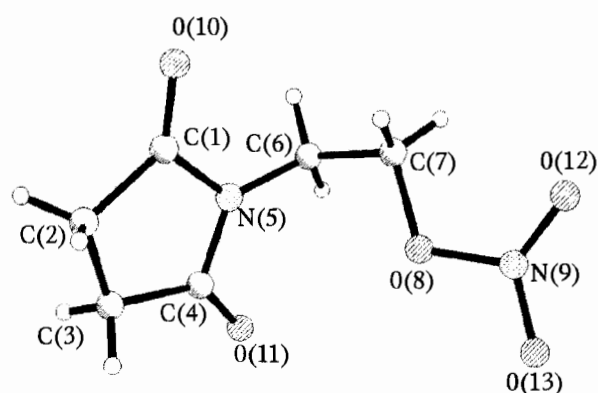


Рис. 2. Молекулярное строение соединения **2** по данным PCA.

Таблица 1. Влияние N-нитроксиметилсукцинимидов (**1**), N-(2-нитроксиэтил)сукцинимидов (**2**), N-(3-нитроксипропил)сукцинимидов (**3**), сукцинимидов (**4**) и препаратов сравнения никорандила (**5**) и теофиллина (**6**) на торможение активности ФДЭЦГМФ ($M \pm m$; % от контроля)

Номер соединения	Концентрация, мкМ			IC_{50} , мкМ
	0.1	0.01	0.001	
1	59±6	45±5	29±3	23
2	78±7*	53±5*	38±3*	4.8
3	49±4	39±4	19±2	8.7
4	0	0	0	—
5	54±4	44±4	30±3	4.2
6	83±8	45±4	30±3	9.6

Примечание. Приведены средние значения 6 опытов. * $p < 0.05$ по сравнению с действием препарата сравнения никорандила (**5**).

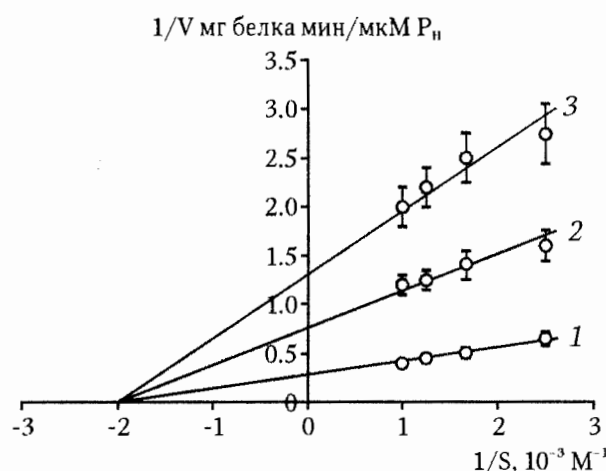


Рис. 3. Зависимость обратной скорости гидролиза цГМФ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

1 — без соединения; 2 — в присутствии никорандила (**5**) в концентрации 0.1 мМ; 3 — в присутствии N-(2-нитроксиэтил)сукцинимидов (**2**) в концентрации 0.05 мМ.

Таблица 2. Влияние соединений **1-3** и **5** на торможение активности ФДЭЦГМФ до и после диализа ($M \pm m$; % от контроля)

Номер соединения	До диализа	После диализа
1	59±6*	0
2	78±7*	0
3	49±4*	0
5	54±5*	0

Примечание. Приведены средние значения 4-6 опытов. Соединения добавляли в концентрации 0.1 мМ. * $p < 0.05$ по сравнению с пробами после диализа.

ратимо тормозит функцию ФДЭЦГМФ с константой ингибирования $K_i = (1.7 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ М, практически в 2 раза меньшей, чем у препарата сравнения никорандила. Полученные результаты позволяют предположить антиагрегационный, антигипертензивный и вазодилататорный эффект данных соединений. Сопоставление свойств соединений **1**, **2** и **3** по их токсичности [8] и способности ингибировать активность ФДЭЦГМФ дает основание рекомендовать соединение **2** как наиболее активное по сравнению с соединениями **1** и **3**, а также по сравнению с препаратом никорандил. Методом РСА установлено пространственное строение соединения **2**, что позволит в дальнейшем провести анализ процессов взаимодействия данного соединения с молекулярными мишенями с помощью компьютерного моделирования.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ государственной регистрации 0089-2019-15).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Д. Методы химии белков. Москва, 1980.
2. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Москва, 1973.
3. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO) Новый путь к поиску лекарств. Москва, 2004.
4. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Экзогенные доноры оксида азота (химический аспект) // Известия АН. Серия химическая. 2002. № 8. С. 1268-1313.
5. Либензон Р.Е., Шеколдина Т.Т., Ватолкина О.С. Фосфодиэстераза аденозин 3, 5-монофосфата коры головного мозга и действие сердечно-сосудистых препаратов // Вопросы мед. химии. 1977. Т. 23, № 4. С. 526-530.
6. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. М., 2006. Т. 14. С. 717-718.
7. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Дифференциальный индикаторный метод определения зон ишемии и некроза при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс // Бюл. экспер. биол. 1989. Т. 107, № 5. С. 534-535.
8. Федоров Б.С., Богданов Г.Н., Фадеев М.А., Лагодзинская Г.В. Синтез и противоишемическая активность нитроксиалкиламидов и нитроксиалкилимидов дикарбоновых кислот // Известия АН. Серия химическая. 2014. № 5. С. 1119-1125.
9. Sheldrick G.M. SHELXTL v. 6.14, Structure Determination Software Suite, Bruker AXS, Madison, Wisconsin, USA, 2000.

Получено 16.01.19