

21 декабря 2001 года исполнилось 100 лет со дня рождения выдающегося отечественного биохимика Сергея Евгеньевича Северина - академика РАН и РАМН, лауреата Ленинской премии, основателя и бессменного (в течение 50 лет) руководителя первой в нашей стране кафедры биохимии Московского Университета. Сергей Евгеньевич прожил долгую жизнь, которую он посвятил служению науке и подготовке нескольких поколений отечественных ученых-биохимиков, многие из которых сейчас составляют цвет Российской науки. Основным интерес и внимание Сергея Евгеньевича как ученого были сосредоточены на изучении биологической роли природных гистидин-содержащих дипептидов (карнозина и ансерина), открытых в начале XX века его учителем Владимиром Сергеевиче Гулевичем. Однако научный кругозор Сергея Евгеньевича был необычайно широк и никогда не ограничивался тематикой своих собственных исследований. По инициативе С.Е.Северина в нашей стране началось широкомасштабное изучение процессов передачи гормонального сигнала и межклеточных взаимодействий, результаты которого периодически обсуждались на Всесоюзных симпозиумах по циклическим нуклеотидам, к организации и проведению которых Сергей Евгеньевич имел самое непосредственное отношение. В настоящее время работы в этой области успешно продолжаются, а результаты фундаментальных исследований приобретают все большую значимость для решения задач практической медицины.

УДК 577.152.6

© Северина И.С.

*100-летию со дня рождения
Сергея Евгеньевича Северина посвящается*

ОКСИД АЗОТА. РОЛЬ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

Северина И.С.

ГУНИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
Погодинская ул. д. 10. Москва, 119992, факс: (095) 245-0857

В статье рассмотрены вопросы, касающиеся молекулярного механизма антигипертензивного и антиагрегационного действия оксида азота (NO).

Показано, что эти эффекты непосредственно связаны с активацией растворимой формы гуанилатциклазы и накоплением циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP). Приводятся данные об основных химических характеристиках гуанилатциклазы: таких как субъединичная структура, изоформы, современные представления о каталитическом и регуляторном центрах фермента. Показаны роль гема и сульфгидрильных групп в функционировании гуанилатциклазы, а также значение нитрозил-гемового комплекса, образующегося при взаимодействии гуанилатциклазы с NO. На основе использованных новых подходов в изучении антигипертензивного и антиагрегационного действия оксида азота и исследования роли гуанилатциклазы в регуляции процесса агрегации тромбоцитов получены фундаментальные, приоритетные данные по разработке молекулярных основ направленного поиска и создания новых эффективных антигипертензивных и антиагрегантных средств. В результате изучения направленной активации растворимой гуанилатциклазы новыми донорами NO выявлены новые активаторы фермента, генерирующие оксид азота в организме и участвующие в регуляции гемостаза и тонуса сосудов. Представлены данные о новых ингибиторах NO-зависимой активации гуанилатциклазы (среди которых оказались и лекарственные препараты) и возможном молекулярном механизме их фармакологического действия.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, агрегация тромбоцитов

ВВЕДЕНИЕ. Одним из наиболее ярких открытий последних лет, имеющих фундаментальное значение и позволившего по-новому подойти к пониманию молекулярного механизма ряда физиологических процессов в клетке, является установление важной роли оксида азота (NO) в регуляции различных физиологических и биохимических процессов. Оксид азота

оказался идентичен эндотелиальному фактору релаксации (ЭДФР) [1]. Эндогенный NO образуется из L-аргинина за счет окисления азота аминогруппы гуанидинового фрагмента под действием L-аргинин-NO-синтазы [2]. Эндогенный NO участвует во многих жизненно-важных процессах. Он является нейротрансмиттером [3], цитотоксическим агентом [4], мощным фактором гемостаза. Оксид азота ингибирует агрегацию тромбоцитов [5] и рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилататор. Антигипертензивные и антиагрегантные свойства NO связаны с функционированием растворимой гуанилатциклазы.

Гуанилатциклаза [(К,Ф, 4.6.1.2 гуанозин-5'-трифосфат-пирофосфатлиаза (циклизующая)] катализирует биосинтез циклического гуанозин-3', 5'-монофосфата (сGMP), вторичного мессенджера, мощного регулятора метаболизма клетки, в значительной степени определяющего ее функции [6].

В 1957 г. Sutherland открыл первый циклический нуклеотид - аденозин-3',5'-монофосфат (сAMP) [7]. Соединение оказалось мощным регулятором различных процессов в клетке, кардинально изменившим существовавшее в то время представление о биологической регуляции в целом. Согласно современным представлениям, функции клетки регулируются сигнальными системами. Рецепторы на поверхности клетки действуют как молекулярные антенны. Они принимают внешний сигнал (от гормонов, факторов роста, нейротрансмиттеров и т.д.) и передают его внутрь клетки при помощи вторичных мессенджеров. Последние контролируют различные процессы в клетках: метаболизм, секрецию, рост клеток и др.. В 1963 г. был открыт второй циклический нуклеотид, вторичный посредник - гуанозин 3',5'-монофосфат (сGMP) [8]. Вначале предполагалось, что оба циклических нуклеотида выполняют одну и ту же роль, затем - противоположные. И, наконец, в настоящее время точно установлено, что сGMP принадлежит самостоятельная (отличная от сAMP) роль в регуляции клеточных процессов [9]. Гидролиз сGMP осуществляется под действием фосфодиэстеразы [10]. Однако основным ферментом обмена сGMP считается гуанилатциклаза и за накопление сGMP в клетках в основном ответственен именно этот фермент.

Гуанилатциклаза существует в двух формах: растворимой и мембраносвязанной. В настоящее время установлено, что эти формы не только разные белки, но и ферменты с различными механизмами регуляции [11]. Растворимая гуанилатциклаза является гетеродимером, состоящим из двух иммунологически различных субъединиц. Мембранная форма - трансмембранный фермент, состоящий из одной полипептидной цепи [9]. В настоящем обзоре будет рассматриваться только растворимая форма гуанилатциклазы, поскольку именно этот фермент лежит в основе молекулярных механизмов физиологических эффектов оксида азота.

Растворимая гуанилатциклаза является широко распространенным ферментом и обнаружена в цитозольной фракции практически всех клеток млекопитающих. В то же время прогресс в понимании физиологической значимости гуанилатциклазы развивался значительно медленнее, чем это происходило с аденилатциклазой. Публикации, которые появились в последние 20 лет показывают, что интерес к аденилатциклазе остается неизменным, тогда как интерес к гуанилатциклазе резко возрос только в конце 80 - годов после установления химической природы ЭДФР как NO [12]. И все же публикации, посвященные ферменту гуанилатциклазе,

отстают от публикаций, касающихся непосредственно оксида азота [12]. Это обусловлено разными факторами, в том числе и значительно более низкими концентрациями внутри клеток растворимой гуанилатциклазы и cGMP, а также трудностями, связанными с выделением и очисткой фермента. Однако самым главным тормозом в выяснении биологической роли растворимой гуанилатциклазы и cGMP оказалось то, что наиболее сильный эндогенный регулятор растворимой гуанилатциклазы был идентифицирован только в конце 80 годов. В 70-е годы было показано, что свободный радикал NO является сильным активатором гуанилатциклазы [13], однако в то время считалось, что биосинтез NO ограничен только бактериями и к млекопитающим он не имеет отношения. Идентификация NO как ЭДФР не только показала, что клетки млекопитающих могут синтезировать эту молекулу, но и что NO является эндогенным активатором растворимой гуанилатциклазы. Так родилась новая внутриклеточная сигнальная система: NO-растворимая гуанилатциклаза- cGMP.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

Растворимая гуанилатциклаза была очищена практически до гомогенного состояния из легких быка [14] и легких крысы [15]. Молекула фермента представляет собой гетеродимер, состоящий из двух иммунологически различных субъединиц: 82 кД (крыса) или 73 кД (бык) и 70 кД, обозначенных как α_1 - и β_1 - субъединицы, соответственно. Из мозга эмбриона человека были выделены субъединицы, обозначенные как α_2 и β_2 . Интересно, что β_2 - субъединица по сравнению с β_1 - содержала дополнительно 86 аминокислотных остатков в С-концевой части молекулы фермента. Количество существующих изоформ и как они соотносятся друг с другом окончательно не выяснено, но установлено, что для активности фермента необходимо наличие двух субъединиц [12].

Растворимая гуанилатциклаза - это гем-содержащий фермент. N-концевая часть каждой субъединицы содержит связывающий гем домен и представляет собой наименее консервативную область белка. Именно гем отвечает за чувствительность фермента к NO [16, 17]. Гем-дефицитная гуанилатциклаза не может активироваться оксидом азота [18] до тех пор пока гем не введен в молекулу фермента; гем- реконструированная гуанилатциклаза - активируется NO [19]. Очищенная гуанилатциклаза содержит 1 молекулу гема на молекулу белка [20]. Появившиеся было в одно время данные о наличии двух молекул гема на 1 моль белка пока не подтвердились и не получили дальнейшего развития. Окисление Fe^{2+} гема в Fe^{3+} снимает чувствительность к NO и может привести к потере гемовой части белка. Поэтому восстанавливающие агенты, такие как тиолы или аскорбиновая кислота, повышают активность фермента и поэтому выделение и очистку гуанилатциклазы всегда проводят в присутствии тиолов. Следует отметить, что растворимая гуанилатциклаза - это сульфгидрильный фермент, имеющий на своей поверхности лабильные SH-группы. Последние легко окисляются различными эндогенными и экзогенными окислителями и способствуют активации фермента [21]. В то же время длительное воздействие окислителей - ингибирует фермент [22]. Гем связывается с белковой молекулой фермента через имидазольный лиганд, которым оказался His 105 β -субъединицы [23]. Эквивалентный остаток в α -субъединице пока не идентифицирован. Однако, для координации гемовой группы в гуанилатциклазе по-видимому, необходим остаток цистеина (дополнительно к His) 105 [24]. Точечная мутация

гистидина 105 β -субъединицы на фенилаланин разрушает связь гема с белком и рекомбинантная гуанилатциклаза теряет способность к активации NO, сохраняя базальную каталитическую активность [24]. Точечная мутация 15 цистеиновых остатков, расположенных в α - и β -субъединицах, на сериновые приводит к появлению рекомбинантных гуанилатциклаз, сохраняющих способность синтезировать cGMP. Мутация же двух цистеиновых остатков (Cys 78 и Cys 214), расположенных в β -субъединице в непосредственной близости от His 105, участвующего в связывании гема, приводит к образованию рекомбинантного белка, нечувствительного к NO [25].

Каталитический и регуляторный центры фермента разобщены и находятся в разных областях субъединиц. Каталитический участок расположен в С-концевой части α - и β -субъединиц. Он ответственен только за образование cGMP и не участвует в активации фермента NO. Каталитический домен проявляет высокую степень аналогии как между мономерами растворимой гуанилатциклазы, так и в отношении С-концевой части мембраносвязанной гуанилатциклазы [26]. Для каталитической активности растворимой гуанилатциклазы необходима коэкспрессия С-концевых частей α - и β -субъединиц. Мономер растворимой гуанилатциклазы не активен [23]. Точная последовательность аминокислотных остатков, ответственных за димеризацию и образование гетеродимера, пока не ясна.

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ОКСИДОМ АЗОТА. Известно, что непосредственным предшественником гема в организме является протопорфирин IX, который оказался сильным активатором фермента [27]. Введение железа в порфириновое кольцо приводит к образованию ферропротопорфирина IX или гема, являющегося ингибитором фермента (см. рис. 1). Хотя цепь реакций, приводящая к

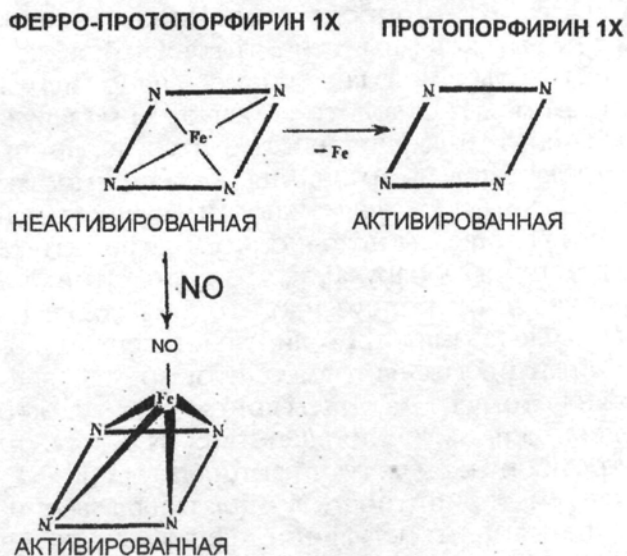


Рисунок 1

Схематическое изображение активации растворимой гуанилатциклазы NO

образованию холофермента гуанилатциклазы, не выяснена, этой системе придется большое значение в эндогенной регуляции фермента. При

активации растворимой гуанилатциклазы NO последний взаимодействует с Fe^{2+} гема с образованием комплекса нитрозил-гем, [18]. При этом атом железа гема выступает из плоскости порфиринового кольца и структура образовавшегося нитрозил-гемового комплекса (истинного активатора растворимой гуанилатциклазы) приближается по структуре к протопорфиру IX - одному из сильных активаторов фермента [28]. Нитрозил-гемовые комплексы могут образовываться и в результате взаимодействия NO (или NO-доноров) с гемом других гемсодержащих белков (гемоглобин, миоглобин, каталаза). Но гуанилатциклаза характеризуется высоким сродством к нитрозил-гемовому комплексу, что определяет возможность переноса его на фермент с других гемсодержащих белков, но не наоборот [29]. Ультрафиолетовый спектр очищенной гуанилатциклазы показывает пик поглощения при 431 нм (полоса Soret) и полосу при 555 нм что характерно для пятикоординационного Fe^{2+} гема, связанного с имидазольным кольцом [30].

МЕХАНИЗМ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИДАЗОТА

Сосудорасширяющее действие оксида азота связано с активацией гуанилатциклазы и накоплением cGMP. Накапливающийся cGMP активирует cGMP-зависимую протеинкиназу, а также Ca^{2+} -АТФазу, участвующих в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выводу Ca^{2+} из мышечных клеток и в конечном итоге - к вазодилатации [31]. Лечебный эффект наиболее известных нитровазодилаторов, таких как нитроглицерин и др. также связан с взаимодействием NO, образующимся в результате их биотрансформации с гемом гуанилатциклазы (по указанному выше механизму), активацией фермента и накоплением cGMP. Таким образом гему гуанилатциклазы принадлежит важная роль в эндогенной регуляции фермента, эффективности действия широкоиспользуемых нитровазодилаторов и в регуляции тонуса сосудов.

Несмотря на то, что природа связи гема с белковой молекулой гуанилатциклазы не выяснена, известно, что она лабильна. При понижении pH, хранении, некоторых методах очистки (например, ионнообменная хроматография) гем может отходить от белковой молекулы, обуславливая определенную степень гем-дефицитности фермента. Прочность связи гема в молекуле гуанилатциклазы различна в зависимости от источника фермента [32]. Данных о возможности существования в тканях растворимой гуанилатциклазы исходно в гем-дефицитной форме мы не нашли. В то же время мы обнаружили, что гуанилатциклаза тромбоцитов крысы не активируется нитропруссидом натрия (табл. 1, см. также [33]). Более детальные исследования привели нас к заключению, что, возможно, растворимая гуанилатциклаза из тромбоцитов крысы изначально является гем-дефицитной и потому тромбоциты крысы не могут быть использованы в качестве модели для изучения действия NO и NO-генерирующих соединений на тромбоцитарную гуанилатциклазу [34].

Понятно, что гем-дефицитность гуанилатциклазы приводит не только к нарушению эндогенной регуляции фермента, но и к снижению эффективности действия органических нитровазодилаторов и к нарушению тонуса сосудов.

МЕХАНИЗМ ВАЗОДИЛАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ

Известно, что NO-группа в молекуле нитропрусида натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})^+(\text{CN})_5]$ находится в виде катиона нитрозония, несет положительный заряд

Таблица 1 Влияние нитропруссид натрия (НН), КЗ $[\text{Cr NO (CN)}_5]$ и $[\text{CoNO(NH}_3)_5] \text{ SO}_4$ на активность гуанилатциклазы супернатантов 105 000g тромбоцитов человека и крысы.

Источник фермента	Без добавок	Добавки		
		НН (0,1 мМ)	1 (0,1 мМ)	11 (0,1 мМ)
Тромбоциты человека	100	1623 \pm 280	546 \pm 120 —	175 \pm 21 —
Тромбоциты крысы	100	100	560 \pm 100 —	470 \pm 50 —

Представлены величины удельных активностей гуанилатциклазы (%) в присутствии НН и соединений. Базальная активность фермента (с Mg^{2+}) принята за 100%.

[35] и легко высвобождается из молекулы нитропруссид натрия. Другие аналоги нитропруссид натрия (с цианидными лигандами) практически не изучены. Имеется лишь одно сообщение, в котором упоминается, что у аниона $[\text{Mn}^{2+} \text{ NO (CN)}_5]$, где NO-группа нейтральна отсутствует антигипертензивный эффект [36]. Поэтому нами были исследованы 2 аналога нитропруссид натрия - нитрозокомплексы переходных металлов Cr и Co: КЗ $[\text{Cr NO(CN)}_5]$ и $[\text{Co NO(NH}_3)_5] \text{ SO}_4$, у которых NO-группа нейтральна. Данные, представленные в таблице 1, показывают, что наибольший стимулирующий эффект на гуанилатциклазу тромбоцитов человека оказывает нитропруссид натрия, активирующее действие которого обусловлено взаимодействием его NO-группы с гемом гуанилатциклазы. Последнее обстоятельство объясняет отсутствие стимуляции нитропруссидом натрия гуанилатциклазы тромбоцитов крысы, которая присутствует в гем-дефицитной форме. Исследуемые нитрозокомплексы Cr и Co стимулируют гуанилатциклазу незначительно и эта степень активации одинакова для гем-содержащей (тромбоциты человека) [37] и гем-дефицитной (тромбоциты крысы) [37] растворимых форм гуанилатциклаз; т.е. приведенные результаты предполагают, что механизм активации гуанилатциклазы этими нитрозокомплексами не связан с гемом. Дальнейшие опыты подтвердили это предположение. В случае гем-дефицитного препарата гуанилатциклазы из тромбоцитов человека, полученного после ионнообменной хроматографии, был резко снижен стимулирующий эффект нитропруссид натрия (на 90 %), но практически не изменилась степень активации гем-дефицитной гуанилатциклазы нитрозокомплексами Cr и Co [38]. Следует особо подчеркнуть, что исследуемые нитрозокомплексы в отличие от нитропруссид натрия не обладали гипотензивным действием. Полученные результаты привели к выводу (который подтверждался и в дальнейших исследованиях), что для реализации антигипертензивного эффекта NO-доноров необходима активация растворимой гуанилатциклазы по NO-зависимому механизму с участием гема фермента.

МЕХАНИЗМ АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА

Известно, что оксид азота и нитропруссид натрия ингибируют агрегацию тромбоцитов. Этот ингибирующий эффект связывали со способностью этих соединений активировать растворимую гуанилатциклазу [39]. В то же время роль гуанилатциклазы в этом процессе была изучена недостаточно. Для выяснения роли гуанилатциклазы мы использовали модель АДФ-индуцированной обратимой агрегации тромбоцитов человека (доноров) *in vitro* в широком диапазоне

концентраций АДФ. Как показали наши эксперименты, степень агрегации тромбоцитов возрастала с увеличением концентрации индуктора агрегации (АДФ), но в каждом отдельном случае носила обратимый характер, т.е. по достижении максимума агрегации происходила дезагрегация тромбоцитов [40]. При исследовании динамики изменений функционирования гуанилатциклазы при развитии агрегации (рис. 2) было показано, что сразу после добавления АДФ начинает увеличиваться степень активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия (рис 2) с

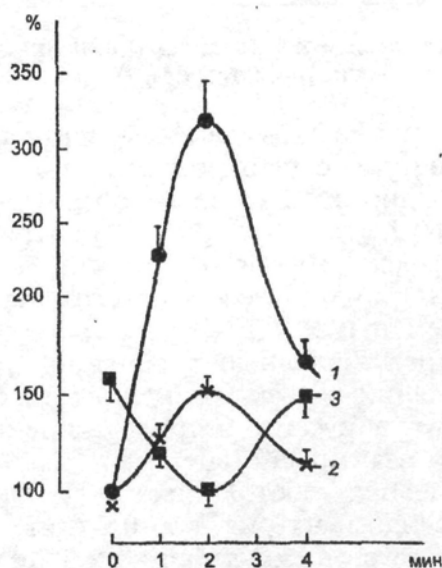


Рисунок 2

Динамика изменений уровня сGMP в тромбоцитах (1), степени активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия (2) и насыщенности фермента гемом (3) при 45-50 %-ной обратимой агрегации тромбоцитов, индуцированных 4-6 мкМ АДР. По оси абсцисс - время (мин) после добавления АДР, по оси ординат - изменения определяемых параметров (% от исходной величины) - кривые 1 и 2; изменения в эффекте гемоглобина на нитропруссидную активацию гуанилатциклазы (%) - кривая 3. Приведены средние значения из пяти однотипных экспериментов.

одновременным повышением уровня сGMP в тромбоцитах (кривые 1 и 2). Кривая 3 отражает влияние гемоглобина на активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия. Видно, что в интактных тромбоцитах до введения АДФ гемоглобин усиливает стимулирующий эффект нитропруссидов натрия. Это связано с дополнительным образованием нитрозил-гемового комплекса за счет гемоглобина и переносом его на гуанилатциклазу. Таким образом, в обычных условиях гуанилатциклаза частично гем-дефицитна. Однако в процессе агрегации стимулирующий эффект гемоглобина снижается и полностью исчезает в точке, соответствующей максимумам нитропруссидной активации и уровня сGMP. После достижения максимума агрегации в процессе последующей дезагрегации все величины возвращаются к исходным. Кривая изменения влияния гемоглобина указывает на увеличение степени насыщенности фермента гемом в процессе агрегации, что может являться причиной повышения стимулируемости гуанилатциклазы нитропруссидом натрия. Активности фосфодиэстеразы в контрольных тромбоцитах и на пике их агрегации не различаются. Следует отметить, что динамика изменений параметров во

время агрегации одна и та же и не зависит от степени агрегации тромбоцитов. Однако пропорциональность между временем достижения пика агрегации и максимумом нитропруссидной активации сохраняется только в пределах 45-50 %-ной агрегации (см. рис. 3). Таким образом, эти изменения происходят на самых ранних (в первые 1-2 мин) стадиях агрегации. Особенно это видно в случае необратимой агрегации; на этой стадии регуляторная роль гуанилатциклазы уже не проявляется (рис. 3, г). Если до введения индуктора агрегации добавить нитропруссид натрия, то увеличения активированности гуанилатциклазы не произойдет [41]; т.е. гуанилатциклаза выполняет защитные функции. Следует отметить, что нитропруссид натрия не только предотвращает агрегацию, но и способствует дезагрегации. На рисунке 4 показано, что нитропруссид натрия, добавленный на пике агрегации, инициирует дезагрегацию, что и объясняет его ингибирующее влияние на агрегацию.

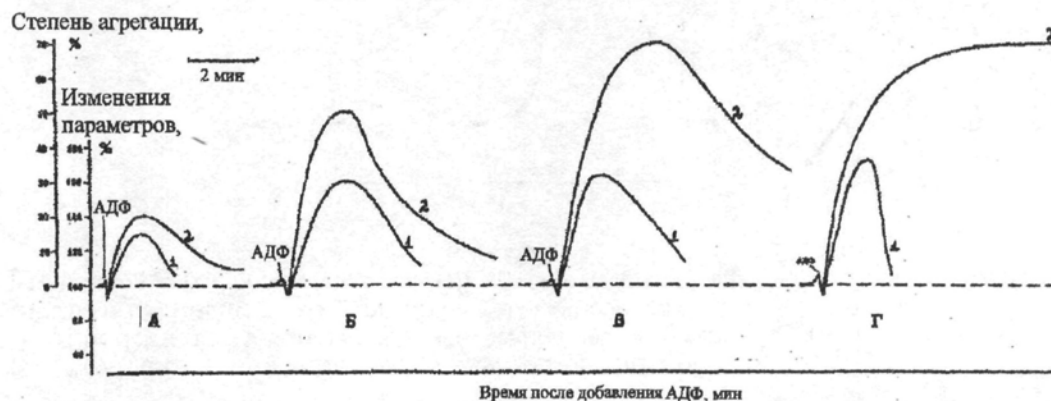


Рисунок 3

Динамика изменений степени активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия (1) при 20 % (А)-, 50 % (Б)- и 70 %-ной обратимой (В) и 70 %-ной необратимой (Г) АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека в концентрациях $2,5 \cdot 10^8$ (А,Б,В) и $4,5 \cdot 10^8$ (Г) тромбоцитов в 1 мл плазмы.

Агрегограммы - кривые 2. По оси ординат - изменения параметров (% от контроля). Представлены результаты типичного эксперимента. Стрелками обозначены моменты добавления АДФ.

Итак, гуанилатциклаза регулирует агрегацию по механизму обратной связи: инициация агрегации способствует активации фермента, а накапливающийся cGMP опосредует сигнал к дезагрегации. Другими словами, функционирование тромбоцитарной гуанилатциклазы и агрегантная способность тромбоцитов взаимосвязаны. Действительно, при сравнении функционирования тромбоцитарной гуанилатциклазы в тромбоцитах больных сахарным диабетом (I и II типов), характеризующихся повышенной способностью к агрегации, и в тромбоцитах здоровых доноров у первых было отмечено снижение базальной активности гуанилатциклазы и способность фермента к активации [40]. При этом чем выше была способность тромбоцитов к агрегации, тем больше были снижены базальная активность гуанилатциклазы и ее способность к активации [40]. Следует заметить что снижение параметров гуанилатциклазы связано не с этиологией диабета, а лишь с нарушением в системе гомеостаза. Таким образом, гуанилатциклазу можно рассматривать как защитный механизм на пути развития агрегации. В этой связи направленная активация гуанилатциклазы оксидом азота и

NO-генерирующими соединениями может быть использована для ослабления патологически увеличенной способности тромбоцитов к агрегации. А поскольку регуляторная роль гуанилатциклазы проявляется на самых ранних стадиях агрегационного процесса, новые активаторы фермента будут способны не только ослаблять гиперагрегацию, но и предупреждать их спонтанную агрегацию, а, следовательно, предупреждать возникновение и развитие сосудистых осложнений.

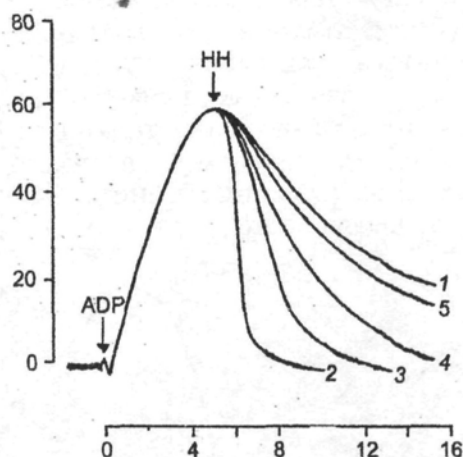


Рисунок 4

Влияние нитропруссид натрия (0 (1), 10^{-4} (2), 10^{-5} (3), 10^{-6} (4), 10^{-7} М (5) на ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека. По оси ординат — агрегация тромбоцитов (%). Стрелками обозначен момент добавления ADP и нитропруссид натрия (НН). Представлены средние значения пяти однотипных экспериментов.

ВОЗМОЖНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ cGMP В ПРОЦЕССЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

На основании литературных данных и результатов собственных исследований на рисунке 5 представлена предложенная нами гипотетическая схема возможных точек приложения cGMP как регулятора процесса агрегации тромбоцитов. Как видно из рисунка, cGMP тормозит освобождение арахидоновой кислоты, предотвращая активацию фосфолипазы A_2 , но он не влияет на следующие стадии распада арахидоновой кислоты под действием циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы. Ингибируя освобождение арахидоновой кислоты, cGMP предупреждает образование тромбоксанов A_2 и B_2 , стимулирующих накопление Ca^{2+} , активацию тромбоцитов и их агрегацию. cGMP тормозит образование 1, 2-диацилглицерола и инозитолтрифосфата, предотвращая активацию фосфолипазы C. 1, 2-Диацилглицерол — сильный активатор протеинкиназы C, которая фосфорилирует белки тромбоцитов 20 и 40 кД, вызывает их активацию и агрегацию. cGMP, предотвращая образование инозитолтрифосфата, тормозит накопление Ca^{2+} , а, следовательно, и активацию тромбоцитов и их агрегацию; он тормозит также образование фосфатидной кислоты, легко образующейся в тромбоцитах под действием киназы фосфорилазы 1, 2-диацилглицерола; фосфатидная кислота действует как ионофор, способствуя высвобождению внутриклеточного Ca^{2+} , вызывает активацию тромбоцитов и их агрегацию. Другими словами, cGMP предотвращает распад фосфолипидов (в том числе и фосфолипидов инозитола) и ингибирует агрегацию посредством общего механизма

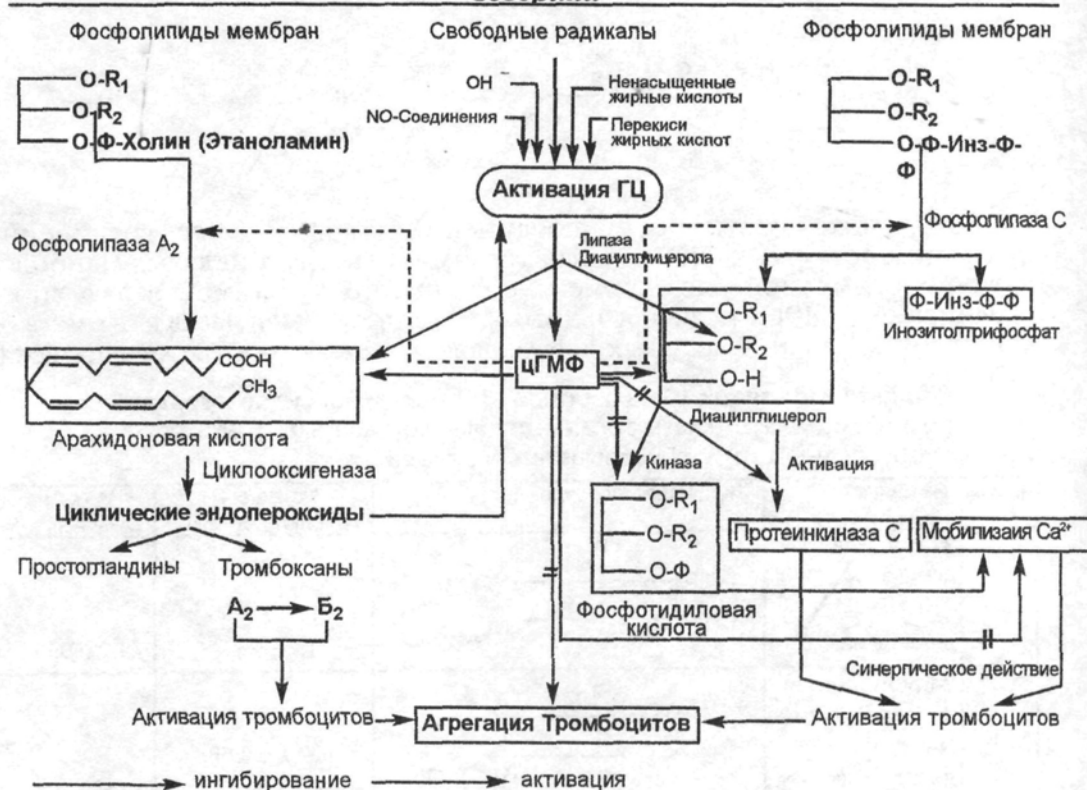


Рисунок 5

Модель, суммирующая возможную роль тромбоцитарной гуанилатциклазы (ГЦ) и циклического гуанозинмонофосфата (сГМФ) в регуляции процесса агрегации тромбоцитов

торможения накопления Ca^{2+} [42]. Кроме того, сГМФ активирует сГМФ-зависимую протеинкиназу (преимущественно протеинкиназу G I - изоформы в тромбоцитах [43]), которая, фосфорилируя целый ряд эндогенных субстратов, предотвращает агрегацию тромбоцитов [44-46].

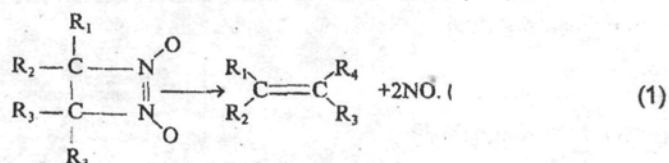
Итак, антигипертензивные и антиагрегантные свойства оксида азота обусловлены активацией растворимой гуанилатциклазы и накоплением сГМФ.

НОВЫЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА - АКТИВАТОРЫ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗ И ИНГИБИТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Установление эндогенной природы оксида азота, идентичного ЭДФР, и роль гуанилатциклазы в проявлении многих биологических эффектов NO привлекли к себе пристальное внимание исследователей. Усилия большого количества ученых во всем мире направлены на синтез соединений, которые могли бы стать источником NO при введении в живой организм и таким образом, оказаться эффективными вазодилататорами.

В связи с изложенным выше задача синтеза новых доноров NO и выявление среди них активаторов гуанилатциклазы представлялась нам перспективной и актуальной для решения одной из наиболее фундаментальных проблем современной биологической и медицинской химии - направленному поиску и синтезу эффективных антигипертензивных и антиагрегантных препаратов на основе изучения влияния NO-генерирующих соединений на растворимую гуанилатциклазу.

Так нами впервые был исследован новый класс отечественных соединений - производных 1, 2-дiazетин-1, 2-ди-N-оксида, способных неферментативно генерировать оксид азота [47, 48] согласно уравнению (1):



Было исследовано семь соединений (табл. 2). Все соединения оказались донорами NO и активаторами гуанилатциклазы. Наиболее активно стимулировало фермент соединение 4, наименее активно - соединение 5 [49]. Среди изученных диазетидинов были выявлены четыре соединения, среди которых наблюдалось четкое соответствие между

Таблица 2. Влияние 1,1-диазетидин-1,2 - ди - N- оксидов на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека в зависимости от разложения соединений с образованием оксида азота.

№ соед	Название	Химическая формула	Активация гуанилатциклазы	Разложение соединений, %
1	3-Бром-3-этил-4,4-диметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{Br} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	12,6 ± 1,96 (35,5%)	41,2 (50,2)
2	3-Бром-3-метил-4,4-диметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{Br} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	27,7 ± 3,68 (80,3%)	67,6 (82,0)
3	3-Бром-3-фенил-4,4-диметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{Br} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	13,2 ± 2,34 (38,4%)	80,0 (97,0)-
4	3-Бром-4-метил-3,4-тетраметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{Br} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{11} - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \end{array} $	34,5 ± 2,07 (100%)	82,0 (100,0)
5	3,4-Пентаметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{11} - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \end{array} $	5,4 ± 1,0 (15,6%)	3,6 (4,4)
6	3-Фенил-4,4-диметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	28,7 ± 3,8 (83,2%)	47,2 (57,6)
7	3-метил-4,4-диметил-ди-N-оксид диазетидина	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \nearrow O \\ \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \parallel \\ \searrow O \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	10,2 ± 1,82 (29,6%)	15,9 (19,4)
8	Нитропруссид натрия	Na ₃ [FeNO(CN) ₅]	14,8 ± 2,0	-

способностью соединений генерировать оксид азота, активировать гуанилатциклазу и проявлять спазмолитическое действие на изолированных кольцах грудной аорты крысы, а также гипотензивный эффект на наркотизированных уретаном спонтанно-гипертензивных крысах (рис. 6, а

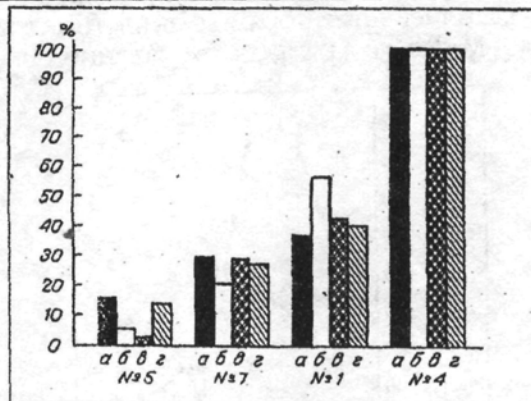
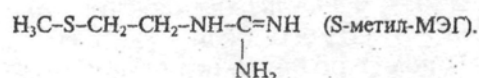
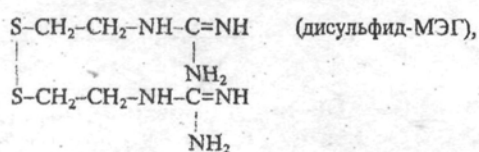
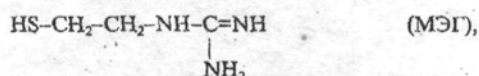


Рисунок 6.

Сравнение эффектов производных диазетин-ди-N-оксида (соединения 5,7,1 и 4). По оси ординат - изменения исследованных параметров (в % по отношению к эффектам соединения 4, принятых за 100%); α - активация гуанилатциклазы тромбоцитов человека; β - количество образующегося NO; θ - спазмолитическая активность; γ - гипотензивный эффект.

также [50]). Способность соединений генерировать NO и активировать гуанилатциклазу находилась в соответствии с их антиагрегантными свойствами: способностью ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека [51] и ускорять дезагрегацию агрегированных тромбоцитов [51]. Наиболее сильный стимулятор гуанилатциклазной активности - соединение 4 (4-бром-4-метил-3, 4-тетраметил-ди-N-оксид диазетина, см. табл. 2) по спазмолитическому эффекту сопоставим с нитроглицерином [50].

Следующим изученным нами классом новых активаторов гуанилатциклазы, генерирующих NO, были производные гуанидинотиолов. На примере этих соединений хорошо прослеживалась взаимосвязь между химическим строением соединений, их способностью генерировать NO, активировать гуанилатциклазу и проявлять антигипертензивные и антиагрегантные свойства. Гуанидинотиолы содержат в своей молекуле одновременно гуанидиновую и сульфгидрильную группы, которые являются соответственно донором и акцептором NO. На примере β-меркаптоэтилгуанидина ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C=NH(NH}_2\text{)}$) было показано, что он является более сильным активатором растворимой гуанилатциклазы, чем L-аргинин [52]. Отсюда предположено, что причиной этого является образование нестойкого внутримолекулярного нитрозотиола, способствующего переносу NO на гем гуанилатциклазы и активации фермента. Для выяснения роли SH-групп гуанидинотиолов в усилении их активирующего влияния на гуанилатциклазу были синтезированы 2 производных β-меркаптоэтилгуанидина (МЭГ): дисульфид меркаптоэтилгуанидина (дисульфид-МЭГ), где имеются 2 гуанидиновые группировки, и метилированный по SH-группе S-метилмеркаптоэтилгуанидин (S-метил-МЭГ).



Все соединения оказались активаторами гуанилатциклазы. Как показано на рис. 7, МЭГ и дисульфид-МЭГ в 2 и 4 раза, соответственно, сильнее активировали

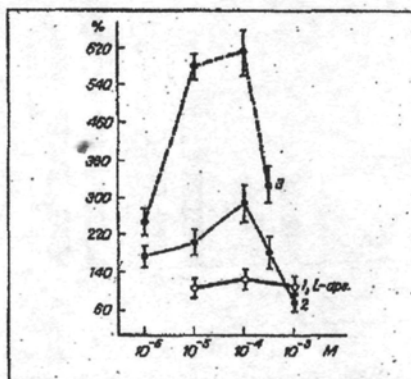


Рисунок 7.

Влияние S-метилмеркаптоэтилгуанидина (1), L-аргинина (L-арг), меркаптоэтилгуанидина (2) и дисульфида меркаптоэтилгуанидина (3) на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека. По оси абсцисс — концентрация соединений (в М) в пробе; по оси ординат — степень активации гуанилатциклазы (в %) по отношению к базальной активности, принятой за 100.

Базальная активность составляла 160 пмоль cGMP/мин на 1 мг белка

гуанилатциклазу чем L-аргинин. Активация фермента S-метил-МЭГ была того же порядка, что и под влиянием L-аргинина. Таким образом была установлена важная роль S-акцепторных групп гуанидинотиолов в усилении стимулирующего влияния этих соединений на активность гуанилатциклазы [52]. В полном соответствии с интенсивностью активирующего влияния исследованных гуанидинотиолов на гуанилатциклазу находятся и их антиагрегантные свойства (рис 8, см. также [53]). Наиболее сильный ингибитор АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека является дисульфид-МЭГ (рис 8). Он же наиболее резко усиливает и дезагрегацию тромбоцитов [53]. Интенсивность стимуляции гуанилатциклазы исследованными гуанидинотиолами определяет и

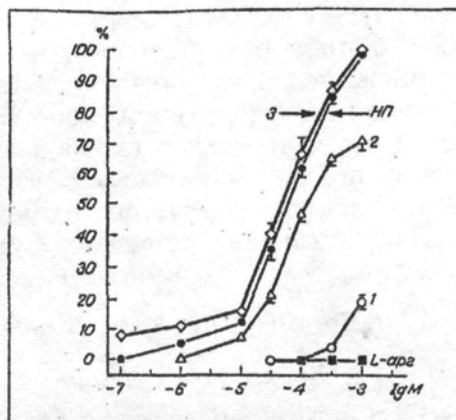
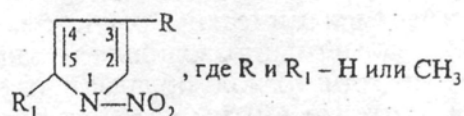


Рисунок 8

Зависимость торможения 50 % ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов человека от концентрации L-аргинина (L-арг), S-меркаптоэтилгуанидина (1), меркаптоэтилгуанидина (2), дисульфида меркаптоэтилгуанидина (3) и нитропрусида натрия (НН). По оси абсцисс — концентрация соединений (-lg M), по оси ординат — торможение (в%)

эффективность их гипотензивного действия при внутривенном введении соединений анестезированным спонтанно-гипертензивным крысам. Дисульфид-МЭГ в 10 раз меньшей концентрации, чем L-аргинин, дает в 2 раза более выраженный гипотензивный эффект [54]. Различия в эффектах МЭГ и S-метил-МЭГ выражены слабее, поскольку в условиях *in vivo* происходят процессы деметилирования [54].

Дальнейшие исследования были посвящены изучению механизма антигипертензивного действия нового класса доноров NO и активаторов гуанилатциклазы - производным N-нитропиразола [55] с общей формулой



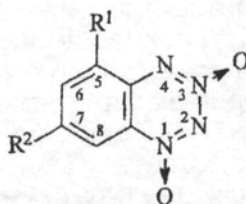
Известно, что электрохимическое восстановление этих соединений в водных растворах сопровождается разрывом связи N-NO₂ с образованием нитрит-иона [56], который в результате последующего восстановления генерирует NO. Аналогичное образование нитрит-иона происходит и при восстановлении нитроэфиров (нитроглицерина) когда разрывается связь O-NO₂ [57]. N-Нитропиразолы, так же как и нитроэфиры, оказывают антигипертензивное действие и их ценность обусловлена возможностью направленного изменения донорно-акцепторных свойств связи N-NO₂ за счет природы заместителей в пиразольном кольце в положениях 3, 4 и 5 (что практически невозможно осуществить в случае нитроэфиров). Было исследовано влияние на гуанилатциклазу семи новых производных N-нитропиразола, различающихся заместителями в 3, 4 и 5 положениях пиразольного кольца (табл.3). Исследованные N-нитропиразолы генерируют

Таблица 3. Влияние N-нитропиразолов на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека

Химическая формула	Степень активации гуанилатциклазы			
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,03	1,0 ± 0,05	0,9 ± 0,05
	1,0 ± 0,03	1,0 ± 0,03	1,3 ± 0,04	0,9 ± 0,04
	1,1 ± 0,03	1,2 ± 0,03	1,7 ± 0,04	1,0 ± 0,05
	1,1 ± 0,02	1,7 ± 0,06	4,0 ± 0,1	4,3 ± 0,04
	1,4 ± 0,02	1,8 ± 0,07	3,3 ± 0,1	1,9 ± 0,11
	1,3 ± 0,11	1,4 ± 0,09	2,9 ± 0,12	2,1 ± 0,13
	1,2 ± 0,02	1,4 ± 0,05	1,5 ± 0,06	1,4 ± 0,03

NO в результате разрыва связи N-NO₂ но с разной интенсивностью [58]. Легкость разрыва связи определяется стабильностью пиразолильного радикала (Pz); чем он более стабилен, тем легче осуществляется высвобождение NO. Наиболее активным донором NO и стимулятором гуанилатциклазной активности оказался 3,5-диметил-N-нитропиразол. Попытки усиления стимулирующего эффекта этого соединения путем дополнительного введения в его молекулу NO₂ группы (в положение 4 пиразольного кольца) или замены CH₃ группы в положение 3 на NO₂ и C₆H₅ (см. табл.3) не увенчались успехом. Интересно, что согласно результатам квантово-механических расчетов, наиболее стабильным является именно 3, 5-диметилпиразолильный радикал. Следует отметить, что 3,5-диметил-N-нитропиразол обладает и наиболее выраженным спазмолитическим и антиагрегантными свойствами [59].

Следующие новые доноры оксида азота и активаторы растворимой гуанилатциклазы были выявлены нами при исследовании производных бензотетразин-1, 3-диоксида (ранее не исследованного нового класса возможных потенциальных доноров NO) общей формулы:



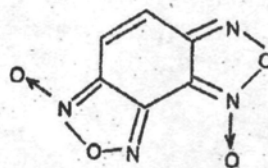
Были исследованы следующие нитрозамещенные бензотетразин-1, 3-диоксиды: 5-нитробензотетразин-диоксид (R₁=NO₂, R₂=H), 7-нитро-бензотетразин-диоксид (R₁=H, R₂=NO₂) и 5, 7-динитробензотетразин-диоксид (R₁=R₂=NO₂). Показано, что все соединения являются тиолзависимыми донорами NO, активаторами гуанилатциклазы и ингибиторами АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека [60]. Эффективность антиагрегантного действия находится в полном соответствии с количеством генерированного NO и интенсивностью стимулирующего эффекта [60]. Наиболее эффективным донором NO, активатором гуанилатциклазы и антиагрегантом является 7-нитробензотетразин-1, 3-диоксид [60].

Итак, исследование влияния на растворимую гуанилатциклазу новых доноров NO, относящихся к различным классам химических соединений, показало, что внутри каждого класса то соединение, которое являлось наиболее эффективным донором оксида азота, наиболее сильно активировало гуанилатциклазу и проявляло наиболее выраженный спазмолитический, гипотензивный и антиагрегантный эффекты; т.е. на основании величины стимулирующего влияния на гуанилатциклазу могла прогнозироваться фармакологическая активность новых доноров NO. Полученные результаты позволяют подойти к решению одной из наиболее фундаментальных проблем современной биологической и медицинской химии - направленному поиску и синтезу новых эффективных вазодилаторов и антиагрегантов.

В последнее время в качестве новых доноров NO широко используются производные фуросана, которые рассматриваются как пролекарства, повышающие уровень cGMP за счет высвобождения NO.

Ранее [61] впервые был синтезирован бензодифуросан и исследованы его антигипертензивные свойства в сравнении с нитроглицерином. Бензодифуросан обладал антигипертензивным действием, превышающим вазодилаторный эффект нитроглицерина [61]; в то же время биохимический механизм этого действия фуросана был неизвестен. Мы

показали (см. рис.9), что бензодифуроксан является тиолзависимым донором оксида азота и активатором растворимой гуанилатциклазы [62].



бензодифуроксан (БДФ)

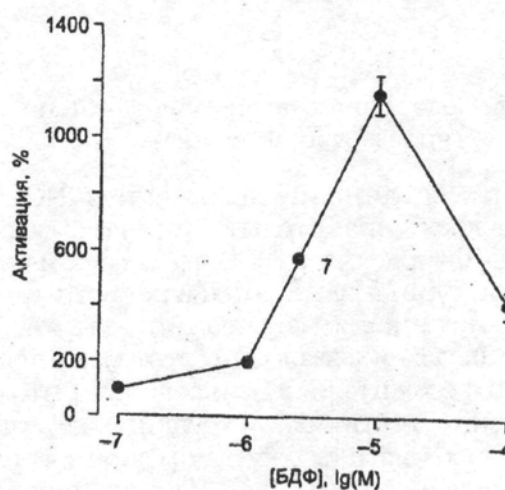
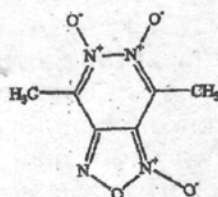


Рисунок 9.

Влияние бензодифуроксана на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека. По оси абсцисс - концентрации соединения [M] в пробе; по оси ординат - степень активации гуанилатциклазы (%) по отношению к базальной активности фермента, принятой за 100 %. Базальная активность составила 103 ± 8 пмоль cGMP / мин / на 1 мг белка. Приведены средние величины из трех-четырех независимых экспериментов, средние стандартные отклонения.

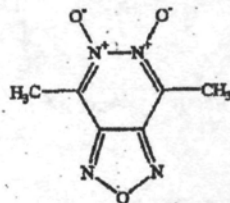
Способность бензодифуроксана генерировать NO и активировать гуанилатциклазу обусловили не только его вазодилаторные, но и антиагрегантные свойства. Бензодифуроксан оказался высокоэффективным ингибитором АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека с величиной IC_{50} $6 \cdot 10^{-8}$ M. Для нитропруссид натрия эта величина была на 3 порядка выше ($5 \cdot 10^{-5}$ M).

Для дальнейшего изучения биохимического механизма возможных антигипертензивных и антиагрегантных свойств производных фуроксана мы исследовали новое производное фуроксана, конденсированное с пиридазин-ди-N-оксидом: 4,7-диметил-1,2,5-оксодиазоло[3,4-d]пиридазин-1,5,6-триоксид.



Оксадiazоло-пиридазин триоксид (ОПТО) (производное фуроксана)

Это соединение является тиолзависимым донором оксида азота и активатором растворимой гуанилатциклазы [63]. Данные свойства определили его высокую вазодилататорную способность [63]. Сравнение свойств этого соединения с его структурным аналогом, но производным фуразана: 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазоло[3,4-d] пиридазин-5,6-диоксид



Оксадиазоло-пиридазин диоксид (ОПДО)
(производное фуразана)

показало, что последнее соединение не является NO-донором и его антигипертензивный эффект значительно уступает вазодилататорному действию производного фуроксана [63]. В то же время оба соединения проявляли практически одинаковый антиагрегантный эффект. Более детальное изучение механизма активации этими соединениями растворимой гуанилатциклазы показало, что этот механизм включает NO-независимую активацию фермента [63]. Не исключено, что оба соединения (за счет наличия пиридазин-ди-N-оксидной группировки) взаимодействуют с Fe^{2+} гема и экстрагируют его из плоскости порфиринового кольца гема с одновременной активацией фермента [63]. Из этих исследований можно сделать два основных вывода: первый - соединение, содержащее в своей молекуле две фармакологически активные структуры: фуроксановую и пиридазин-ди-N-оксидную будут обладать преимуществом при лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний (на основании этих результатов получен патент РФ [64]), и второй вывод - для реализации гипотензивного эффекта необходима NO-зависимая активация гуанилатциклазы, тогда как для ингибирования агрегации тромбоцитов механизм активации фермента несущественен.

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

Как уже было отмечено выше, после установления химической природы эндотелиального фактора релаксации (ЭДФР) как NO «родилась» новая внутриклеточная сигнальная система: NO-растворимая гуанилатциклаза-cGMP. Важная роль этой повсеместно распространенной сигнальной системы в функции клеток, нарушение активности этой системы при многих патологических состояниях (гипертония, астма, сепсис, септический шок, злокачественные новообразования) и необходимость устранения этих нарушений настоятельно требуют создания препаратов, способных селективно модулировать активность растворимой гуанилатциклазы. Следует отметить, что создание таких модуляторов гуанилатциклазной активности - это одна из основных проблем в изучении этого фермента. Что касается гипертонии, при которой наблюдается дефицит в образовании эндогенного оксида азота, то в настоящее время уже имеется целый арсенал новых доноров NO. Что же касается таких заболеваний как астма, сепсис, септический шок, мигрень, связанных с резким усилением образования NO и необходимостью

торможения NO-зависимой активации гуанилатциклазы - такие препараты практически отсутствуют. Известные ингибиторы растворимой гуанилатциклазы, такие как метиленовая синь, LY 83583 - неспецифичны [12]. Недавно предложенный ингибитор NO-зависимой активации 1H[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]хиноксалин-1 (ODQ) [65] на самом деле оказался ингибитором гем-зависимой активации гуанилатциклазы [66].

Мы исследовали влияние на активность гуанилатциклазы и активацию фермента NO-донорами карнозина, эндогенного дипептида (β -аланил-L-гистидина), открытого В.С.Гулевиным в составе экстрактивных соединений мышечной ткани в начале XX в [67]. К настоящему времени установлены важные биологические функции, выполняемые этим природным дипептидом, в частности, способность проявлять антиоксидантные свойства [68, 69]. Карнозин широко используется в качестве терапевтического средства при лечении катаракты, поверхностных ожогах эпидермиса, заживлении ран [69]. При исследовании влияния карнозина на функционирование гуанилатциклазы было показано (табл. 4), что он

Таблица 4 Влияние карнозина на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента нитропруссидом натрия (НН, 100 мкМ) и протопорфирином IX (ПТП, 5 мкМ).

Фермент	Активность по моль сGMP/мин/мг белка	Степень активации	
		НН	ПТП
Суаернатант 105 000g без карнозина	183 \pm 10	29 \pm 2,0	6,8 \pm 0,4
с карнозином 1 мМ	177 \pm 10	10 \pm 1,6	6,5 \pm 0,2
5 мМ	142 \pm 11	5,7 \pm 1,7	
Экстракт ДЭА3-целлюлозы без карнозина	1185	4,1 \pm 0,9	7,5 \pm 1,0
с карнозином (1 мМ)	1195	4,4 \pm 1,0	7,9 \pm 0,5

Приведены средние величины из четырех-пяти независимых экспериментов \pm средние квадратичные отклонения

практически не влияет на базальную активность фермента, но резко тормозит (\sim на 80 %) активацию фермента нитропруссидом натрия. В то же время, карнозин не влияет на незначительную (не связанную с гемом гуанилатциклазы) активацию нитропруссидом натрия гем-дефицитного фермента (после очистки его с помощью ионно-обменной хроматографии) и не влияет на активацию фермента протопорфирином IX, стимулирующий эффект которого не связан с гемом гуанилатциклазы [70]. Эти данные позволили предположить, что карнозин тормозит NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Для подтверждения этого необходимо было выяснить влияние карнозина на активацию гуанилатциклазы другими NO-донорами. На следующей таблице 5 видно, что карнозин тормозит на 74 % не только активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия, но и активацию фермента прямым донором NO - Sin-1 на 73 % (см. также [71]). Кроме того, карнозин ингибирует (на 61 %) активацию гуанилатциклазы производным фуросана, конденсированного с пиридазин-ди-N-оксидом (4,7-диметил-1,2,5-оксадиазоло[3,4-d]пиридазин-1,5,6-триоксид), который является NO-донором (табл. 5, см. также [71]). В то же время, карнозин не влияет на активацию гуанилатциклазы структурного аналога фуросана, соответствующего производного фуразана (4,7-диметил-

Таблица 5 Влияние карнозина (1 мкМ) и ODQ на активацию гуанилатциклазы (ГЦ) тромбоцитов человека нитропруссидом натрия (НН), 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазоло[3,4-d]пиридазин-1,5,6-триоксазидом (ОПТО), 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазоло[3,4-d]пиридазин-5,6-диоксидом (ОПДО) и сиднониминном (Sin-1).

Добавки	Удельная активность ГЦ (пмоль cGMP/мин/мг белка)	Активация (%)	Ингибирование (%)
НН (0,1 мМ)			
без карнозина	1256 ±100	1570	
с карнозином	326 ± 26	408	74
с ODQ (0,3 мкМ)	314 ±20	392	75
ОПТО (0,01 мМ)			
без карнозина	1961 ±137	2451	
с карнозином	763 ± 60	954	61
с ODQ (0,3 мкМ)	1176 ±80	1470	40
ОПДО (0,01 мМ)			
без карнозина	1504 ±140	1880	
с карнозином	1530 ±137	1912	0
с ODQ (0,3 мкМ)	797 ±47	996	47
Sin-1 (0, 01 мМ)			
без карнозина	1040 ±95	1300	
с карнозином	281 ±30	351	73

Приведены средние значения из трех-четырёх независимых экспериментов ± средние стандартные квадратичные отклонения. Базальная активность ГЦ составляет 80 ± 7 пмоль cGMP/мин/мг белка.

1,2,5-оксадиазоло[3,4-d]пиридазин-5,6-диоксид), который не является NO-донором [63]. Следует отметить, что ODQ, который до последнего времени считался селективным ингибитором NO-зависимой активации гуанилатциклазы тормозит в одинаковой степени (на 40 и 47 %, соответственно) активацию гуанилатциклазы производным фуросана (NO-донора) и его структурного аналога - фуразана (см. табл.5, а также [71]), хотя последний не является NO-донором [63]. Каков возможный механизм ингибирования карнозином NO-зависимой активации гуанилатциклазы? Карнозин (согласно литературным данным [69]) не взаимодействует с NO, поэтому он не может быть ловушкой последнего. Но карнозин конкурирует с нитропруссидом натрия за связывание с гемом гуанилатциклазы [70]. Известно, что карнозин образует хелатные комплексы с двухвалентными металлами (Cu, Co, Zn, Mn, Fe) [69]. Комплексы с Fe^{2+} считаются неустойчивыми и легко диссоциируемыми, но не исключено, что при взаимодействии карнозина с атомом железа в составе гема образуется более устойчивый комплекс, препятствующий связыванию гемового железа с NO-группой. На взаимодействие карнозина с железом гема могут указывать и наши предварительные данные о снижении поглощения при 428 нм (полоса Core) в спектре восстановленного гемоглобина при добавлении карнозина [71]. Выявленная способность карнозина избирательно ингибировать NO-зависимую активацию гуанилатциклазы может расширить область его применения в качестве лечебного средства; например, при сепсисе, септическом шоке, сопровождающихся сильным генерированием оксида азота и активацией гуанилатциклазы. Следует подчеркнуть, что карнозин нетоксичен, полностью метаболизируется в организме человека, не накапливается в органах и тканях при длительном использовании и к тому же удобен для применения в клинической практике [69].

Интересно, что ингибитором активации растворимой гуанилатциклазы нитропруссидом натрия оказался и другой эндогенный регулятор - изатин,

ингибитор моноаминоксидазы [Medvedev et al. 2002, Biochem. Pharmacol. (in press)]. Роль изатина в функционировании растворимой гуанилатциклазы и значение полученных предварительных результатов пока не выяснены.

Следующим ингибитором NO-зависимой активации гуанилатциклазы оказался муколитический препарат - амброксол. Амброксол успешно используется в настоящее время при лечении астмы и других воспалительных процессов в дыхательных путях, характеризующихся избыточным генерированием оксида азота. Интенсивное образование NO при этих патологических состояниях обусловлено экспрессией индуцибельной NO-синтазы [72], которое сопровождается резким повышением активности растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP [73]. Для изучения возможного биохимического механизма терапевтического эффекта амброксола мы исследовали влияние амброксола на активность растворимой гуанилатциклазы и активацию фермента NO-донорами (нитропруссидом натрия и Sin-1) [74]. Рис. 10 показывает, что амброксол снижает активацию гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и легких крысы примерно с одинаковой интенсивностью (величины IC_{50} составляли 3,9 и 2,1 мкМ соответственно). Амброксол тормозит также (на 73 %) активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека Sin-1 - другого NO-донора . Ингибирование амброксолом NO-зависимой активации гуанилатциклазы подтверждалось также серией независимых экспериментов по стимулированию ферментативной активности протопорфирином IX, активация которым (в отличие от NO) не связана с гемом [28]. Амброксол в конечной концентрации 10 мкМ не влиял на активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека протопорфирином IX (5 мкМ) (активность

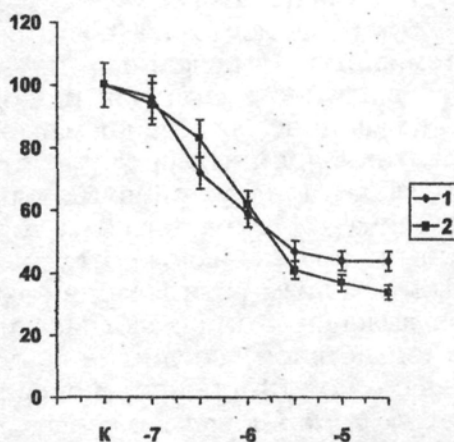


Рисунок 10

Влияние амброксола на стимулированную нитропруссидом натрия активность гуанилатциклазы из тромбоцитов человека (1) и легких крысы (2).

Активность растворимой гуанилатциклазы определена в присутствии 100 мкМ нитропруссидом натрия в отсутствие (К) и присутствии амброксола (0,1 - 50 мкМ). По оси абсцисс - концентрация амброксола в пробе (lg M); по оси ординат - стимулированная нитропруссидом натрия активность гуанилатциклазы в отсутствие амброксола (К) принята за 100 %. Базальная активность гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и легких крысы составляла 152 ± 16 и $18 \pm 1,8$ пмоль cGMP / мин / на 1 мг белка соответственно. Гуанилатциклазная активность из тромбоцитов человека и легких крысы в присутствии 100 мкМ нитропруссидом натрия составляла 1733 ± 140 и 413 ± 28 пмоль cGMP / мин на 1 мг белка, соответственно. Приведены средние величины из трех независимых экспериментов \pm средние стандартные отклонения.

гуанилатциклазы в присутствии и без амброксола составляла 428 ± 25 и 403 ± 20 пмоль cGMP /мин·1мг белка; базальная активность фермента составляла $84 \pm 3,8$ пмоль cGMP /мин·1мг белка). Эти данные указывают, что молекулярный механизм терапевтического действия амброксола включает ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы [74]. Таким образом, впервые выявленная способность амброксола избирательно тормозить NO-зависимую активацию гуанилатциклазы, а также обнаруженная аналогия в интенсивности ингибирования амброксолом активации NO-донором 2х гуанилатциклаз : из тромбоцитов человека и легких крысы (см рис. 10, а также [74]) показывает, что исследование гуанилатциклазной активности в тромбоцитах больных астмой и ингибирование этой активности амброксолом можно использовать для разработки нового биохимического теста для определения тяжести заболевания и эффективности лечения амброксолом используя тромбоциты. Поскольку воспалительные процессы в дыхательных путях у людей и больных астмой сопровождаются экспрессией индуцибельной NO-синтазы было выдвинуто представление о возможном создании новых муколитических препаратов на основе ингибиторов NO-синтазы [73]. Полученные нами данные о торможении амброксолом NO-зависимой активации гуанилатциклазы впервые указывают на возможность создания новых муколитических препаратов на основе ингибиторов NO-зависимой активации гуанилатциклазы [74].

Наши дальнейшие исследования по изысканию новых ингибиторов NO-зависимой активации гуанилатциклазы привели нас к изучению возможной роли растворимой гуанилатциклазы при малярии. Малярия широко распространена во многих регионах мира. Отсутствие вакцины и опасность развития устойчивости к используемым антималярийным лекарствам настоятельно требуют поиска и создания новых антималярийных средств. Артемизинин, выделенный из экстрактов *Artemisia annua* и относящийся к группе эндопероксид-содержащих сесквитерпеноидов, применяется в медицине для лечения малярии [75, 76]. В отличие от многих других антималярийных средств артемизинин эффективен против форм этого заболевания, устойчивых к препаратам группы производных 4-аминохинолина [77]. Кроме того, в настоящее время неизвестен ни один малярийный токсин человека, устойчивый к артемизинину [78]. Молекулярный механизм антималярийного действия артемизинина окончательно не выяснен. Фармакологический эффект препарата связывают с взаимодействием соединения с гемом (феррипротопорфирином IX) или с гемом (ферропротопорфирином IX). Малярийный паразит *Plasmodium falciparum* попадая в кровь гидролизует гемоглобин и приводит к освобождению его простетической группы - гема. Окислительная полимеризация гема способствует образованию малярийного пигмента, β -гематина (гемозоина) [79]. Предполагается, что взаимодействие артемизинина с гемом тормозит образование гемозоина и определяет эффективность антималярийного действия артемизинина [80]. Следует отметить, что целый ряд соединений, в том числе и метиленовый синий, способные связываться с гемом, обладают антималярийной активностью [81, 82].

В настоящее время известно, что метиленовый синий ингибирует активность растворимой гуанилатциклазы и активацию фермента NO-донорами [83]. Роль гуанилатциклазы при малярийной интоксикации не

изучена. Роль оксида азота в патогенезе и развитии малярии, несмотря на многочисленные исследования, не выяснена. Существующие по этому вопросу точки зрения достаточно противоречивы. Недавно появилось сообщение, что зараженные *P. falciparum* эритроциты человека синтезируют большое количество NO, по-видимому, за счет индукции специфической формы NO-синтазы, отличной от форм, найденных в клетках млекопитающих [84]. В этой связи интересны данные, показывающие, что гемовая часть молекулы малярийного пигмента (β -гематина) тормозит избыточное образование оксида азота [85]. Не исключено, что это может быть причиной противоречивости результатов о генерировании NO при малярии и роли оксида азота при этом заболевании. Для изучения возможной роли гуанилатциклазы в механизме фармакологического действия артемизинина исследовали влияние последнего на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента NO-донорами (нитропруссидом натрия, Sin-1 и производным фуросана - 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазоло-2-оксидом). Артемизинин не влияет на базальную активность гуанилатциклазы, но тормозит активацию фермента нитропруссидом натрия [86]. На рис. 11 показано зависимое от концентрации артемизинина снижение стимулируемости гуанилатциклазы тромбоцитов человека нитропруссидом натрия с величиной IC_{50} 5,6 мкМ. Артемизинин (10 мкМ) тормозит также активацию гуанилатциклазы 10 мкМ Sin-1 (на $81 \pm 7\%$) и 10 мкМ 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазоло-2-оксидом (на $71 \pm 4\%$). Ингибирование артемизинином NO-зависимой активации гуанилатциклазы подтверждалось также отсутствием влияния артемизинина (10 мкМ) на стимуляцию фермента протопорфирином IX (5 мкМ), активация которым (в отличие от NO) не связана с гемом (гуанилатциклазная активность без и в присутствии артемизинина составляла 371 ± 30 и 393 ± 20 пмоль cGMP/мин-на 1 мг белка соответственно; базальная активность гуанилатциклазы равнялась 46 ± 7 пмоль cGMP/мин-на 1 мг белка).

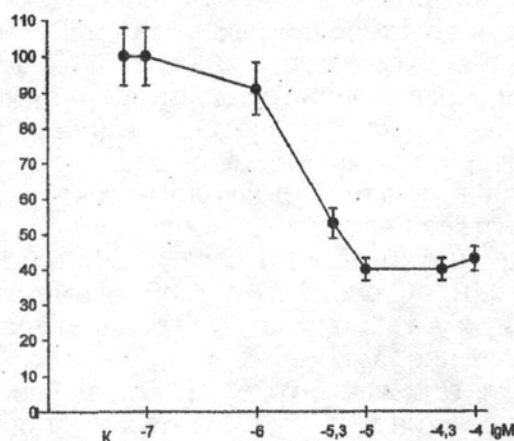


Рисунок 11

Влияние артемизинина на стимулированную нитропруссидом натрия активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека.

Активность растворимой гуанилатциклазы определяли в присутствии 100 мкМ нитропруссида натрия в отсутствие (K) и присутствии артемизинина (0,1 мкМ - 100 мкМ). По оси абсцисс - концентрация артемизинина в пробе (lg M); по оси ординат - стимулированная нитропруссидом натрия активность гуанилатциклазы в отсутствие артемизинина (K) принята за 100 %. Базальная активность составляла 93 ± 13 пмоль cGMP/мин-на 1 мг белка. Активность гуанилатциклазы в присутствии 100 мкМ нитропруссида натрия составляла 1088 ± 110 пмоль cGMP/мин-на 1 мг белка. Приведены средние величины из четырех независимых экспериментов, средние стандартные отклонения.

Способность артемизинина ингибировать активацию гуанилатциклазы NO-донорами, но не протопорфирином IX предполагает участие гема гуанилатциклазы в этом процессе. Возможно, что выявленное действие артемизинина обусловлено взаимодействием оксида азота с кислородными радикалами, генерирующимися из артемизинина во время его реакции с гемом гуанилатциклазы. Однако, отсутствие влияния супероксиддисмутазы и каталазы на ингибирующую способность артемизинина исключает такую возможность [86]. Артемизинин не влияет на активность NO-синтазы мозга крысы [86]. Следовательно, возможное взаимодействие артемизинина с гемом NO-синтазы не может быть ответственным за ингибирование этим препаратом активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия.

Молекулярный механизм выявленной нами ингибиторной способности артемизинина пока неясен и требует дальнейшего изучения. Имеющиеся в литературе данные о роли NO при малярии пока не позволяют сделать вывод о биохимическом механизме, ответственным за терапевтический эффект артемизинина. В то же время следует подчеркнуть, что ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы артемизинином происходит в пределах его терапевтических концентраций (от 0,2 до 12,8 мкМ [87]) и величина IC_{50} для артемизинина, определенная нами и равная 5,6 мкМ как раз находится в интервале этих концентраций [86].

При фармакологической оценке обнаруженного нами эффекта артемизинина следует принимать во внимание тот факт, что в ряде случаев протекание *Pfalciparum* малярии характеризуется патофизиологическими изменениями, выражающимися в сильной системной и легочной вазодилатации, что может приводить к летальным исходам [88, 89]. Данное патологическое состояние имеет много общего с септическим шоком, который сопровождается резким усилением NO-зависимой активации гуанилатциклазы [12]. Гипотензию при септическом шоке можно было купировать метиленовым синим, который повышал давление у каждого пациента [90, 91]. Не исключена возможность аналогичного действия артемизинина. Таким образом, представленные данные о тормозящем действии артемизинина впервые свидетельствуют о наличии у этого препарата нового биохимического эффекта, вносящего, по нашему мнению, существенный вклад в общее фармакологическое действие артемизинина. Это предполагает перспективность поиска новых антималярийных средств среди ингибиторов NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы и обосновывает необходимость учета влияния антипротозойных и противопаразитарных препаратов на активность растворимой гуанилатциклазы.

Итак, растворимая гуанилатциклаза играет центральную роль в передаче внутриклеточных и внеклеточных сигналов, передаваемых NO и физиологическое значение этого фермента огромно. Однако, несмотря на большие успехи, достигнутые в последние годы в изучении гуанилатциклазы биологическая роль и физиологическая значимость фермента пока не выяснены. Поиск и создание селективных модуляторов активности гуанилатциклазы и исследование механизма их действия будут способствовать выяснению биологической роли гуанилатциклазы и физиологической значимости фермента. Не менее существенным является возможность использования избирательных модуляторов гуанилатциклазной активности в качестве терапевтических средств.

Результаты собственных исследований получены при поддержке РФФИ (99-04-48659, 00-04-48446).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palmer R.M.J., Ferrige A.G., and Moncada, F.* (1987) *Nature*, **327**, 524-526
2. *Palmer R.M.J., Ashton D.S., and Moncada, F.* (1988) *Nature*, **333**, 664-666
3. *Knowles R.J., Palacios M., Palmer R.M.J., and Moncada, F.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5159-5162
4. *Hibbs G.B., Tailor R.E., and Varvin Z.* (1987) *Science*, **235**, 473-476
5. *Busse R., Luchoff A., and Bassenge E.* (1987) *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **336**, 566-571
6. *Murad F.*, (1994) *Adv. Pharmacol.*, **26**, 19-36
7. *Sutherland E.W., and Rall I.W.* (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3608-3611
8. *Ashman D.F., Lipton R., Melicow M.M. and Price T.D.* (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 330-334
9. *Walter U.* (1984) *Adv. Cycl. Nucl. Protein Phosphoryl. Res.* **17**, 249-258
10. *Beavo J.A.* (1988) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **22**, 1-38
11. *Trembley J., Gerzer R., and Hamet P.* (1988) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **22**, 319-383
12. *Hobbs A.J.* (1997) *TIPS*, **18**, 484-491
13. *Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S and Murad, F.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3203-3207
14. *Koesling D., Herz J., Gausepohl H., Niroomand F., Hinsch K.D., Mulsch A., Bohme E., Schultz G., and Frank R.* (1988) *FEBS Lett.* **239**, 29-34
15. *Kamisaki Y., Sacheki S., Nakane M., Palmieri J.A., Kune T., Chang B.Y., Waldman S.A., and Murad F.* (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7236-7241
16. *Ignarro L.J., and Wood K.S.* (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **928**, 160-170
17. *Gerzer R. and Garbers, D.L.* (1982) *Fed. Proc.* **41**, 1410
18. *Graven P., and De Ruberties, F.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 310-321
19. *Oblstein E.H., Wood K.S., and Ignarro, L.* (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 187-198
20. *Wolin M.S., Wood K.S., and Ignarro L.* (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13312-13320
21. *Braugher J.M.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 94-104
22. *Gerzer R., Bohme E., Hofmann F., and Schultz G.* (1981) *FEBS Lett.*, **132**, 71-74
23. *Wedel B., Harteneck C., Foerster J., Friebe A., Schultz G., and Koesling D.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24871-24875
24. *Stone J.R., and Marletta M.A.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 14668-14674
25. *Friebe A., Wedel B., Harteneck G., Foerster J., Friebe A., Schultz G., and Koesling D.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 1194-1198
26. *Thorpe D.S., and Garbers D.L.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 6545-6549
27. *Gerzer R., Hofmann F., and Schultz G.* (1981) *Eur. J. Biochem.*, **116**, 479-486
28. *Ignarro L., Wood K.S., and Wolin M.S.* (1984) *Adv. Cycl. Nucl. Protein. Phosphoryl. Res.* **17**, 267-274
29. *Ignarro L.J., Adams J.B., Horwitz P.M., and Wood K.S.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 4997-5002
30. *Stone J.R., and Marletta M.A.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 5636-5640
31. *Ignarro L.J.* (1990) *Pharmacol. Toxicol.*, **67**, 1-7

32. Tsai S., Adamik R.A., Manganiello V., and Vaughan M. (1988) *Biochem. J.*, **215**, 447-455
33. Severina I.S. (1988) *Biochem. Int.*, **17**, 265-278
34. Бусыгина О.Г., Северина И.С. (1991) *Биохимия*, **56**, 487-493
35. Swinehart J.H. (1967) *Coord. Chem. Rev.*, **2**, 385-402
36. Markwardt F., Glusa E., Sturebecher J., Jhon W., and Kaizer B. (1978) *Acta Biol. Med. Germ.*, **37**, 469-478
37. Severina I.S., Bussygina O.G. (1991) *Biochem. Int.*, **23**, 1143-1154
38. Seberina I.S., Bussygina O.G., Grigoryev, N.B. (1992) *Biochem. Int.*, **26**, 695-705
39. B.T., Ignarro L.J., Ohlstein E.H., Pontecorvo E.G., Hyman A.L., and Kadowitz P.J. (1981) *Blood*, **57**, 946-955
40. Chirkov Yu.Yu., Tyshchuk I.A., Severina I.S. (1990) *Experientia*, **46**, 697-699
41. Чирков Ю.Ю., Белишккина Н.Н., Тыщук И.А., Северина И.С. *Бюлл. эксп. Биол. Мед.* № 7, 152-154
42. Severina I.S. (1992) *Adv. Enzyme Regulat.* **32**, 35-56
43. Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Stess W., Fassler R., Ruth Krombach F., and Hoffmann F. (1999) *J. Exp. Med.*, **189**, 1255-1264
44. Waldmann R., and Walter U. (1989) *Eur. J. Pharmacol.* **159**, 317-320
45. Walter U., Eigenthaler M., Geiger J and Reinhard M. (1993) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **344**, 237-249
46. El-Daber S.S., Eigenthaler M., Walter U., Furuichi T., Miyawaki A., Mikoshiba K., Kakkar V.V., and Authi. K.S. (1996) *Thromb. Haemost.*, **76**, 1063-1071
47. Володарский Л.Б., Тихонова Л.А. (1985) *Химия гетероцикл. соед.* № 6, 748-752
48. Kirilyuk I.A., Utepbergenov D.I., Mazhykin D.G., Fechner K., Mertsch K., Khratsov V.V., Blasig I.E., and Haseloff R.F. (1998) *J. Med. Chem.* **41**, 1027-1033
49. Ряпосова И.К., Григорьев Н.Б., Северина И.С. (1994) *Биохимия*, **59**, 537-542
50. Severina I.S., Ryaposova I.K., Volodarskyi L.B., Mazbukin D.G., Tichonova A.Ya., Schwartz G. Ya., Granik V.G., Grigoryev D.A., Grigoryev N.B. (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **30**, 357-366
51. Severina I.S., Belushkina N.N., Grigoryev N.B., (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **33**, 957-967
52. Severina I.S., Bussygina O.G., Vinograd L.H., Grigoryev N.B. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 509-518
53. Белишккина Н.Н., Северина И.С. (1996) *Биохимия*, **61**, 2140-2146
54. Granik V.G., Grigoryev N.B., Vinograd L.H., Severina I.S., Mashkovskiy M.D., Nikitin V.B., Engalycheva G.N., Kalinkina M.A., Bussygina O.G. (1996) *Mendeleev Commun.*, 161-163
55. Bayer J.H. (1986) *Nitroazoles*, VCH, Weinheim
56. Laviron E., and Fournari P. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **82**, 518
57. Laviron E., Fournari. P and Grensard J. (1967) *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **232**, 1255
58. Белишккина Н.Н., Григорьев Н.Б., Северина И.С. (1994) *Биохимия*, **59**, 1689-1697
60. Пятакова Н.В., Хропов Ю.В., Чураков А.М., Тарасова Н.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф., Тартаковский В.А., Северина И.С. (2002) *Биохимия*, **67**, 396-402
61. Gosh R.B., and Everitt B.J. (1974) *J. Med. Chem.*, **17**, 203-206
62. Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В., Хропов Ю.В., Овчинников И.В., Махова Н.Н.,

- Северина И.С. (2000) Биохимия, **65**, 540-546
63. Kotz AY., Grafou MA, Khropov Yu.V., Betin VL, Belushkina NN, Bussygina O.G., Yazykova M.Yu., Ovchinnikov IV., Kulikov AS, Makhova NN, Medvedeva NA, Bulargina TV., Severina IS. (2000) Brit. J. Pharmacol. **129**, 1163-1177
64. Коц А.Я., Хропов Ю.В., Графов М.А., Куликов А.С., Овчинников И.В., Белишкина Н.Н., Бусыгина О.Г., Гаврилова С.А., Махова Н.Н., Медведева Н.А., Буларгина Т.В., Северина И.С. (2001) Патент РФ на изобретение № 216526 от 20. 04
65. Garthwaite J., Southam E., Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt R, and Mayer B. (1995) Mol. Pharmacol. **48**, 184-188
66. Schreammel A., Bebrends S., Schmidt K., Koesling D., and Mayer B. (1996) Mol. Pharmacol. **50**, 1-5
67. Gulewitsch V.S., Amtradzibi S. (1900) Der. Deutsch. Chem. Ges., **33**, 1902-1903
68. Boldyrev AA, Dupin AM, Pindel EV, Severin SE. (1988) Comp. Biochem. Physiol., **89B**, 245-250
69. Болдырев А.А. (1998) В кн. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине Из-во МГУ, Москва, с. 252-269
70. Бусыгина О.Г., Северина И.С. (1990) Биохимия, **55**, 1812-1818
71. Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В. (2000) Биохимия, **65**, 921-927
72. Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Sinebourne E, and Barnes PJ. (1994) Lancet, **343**, 133-135
73. Barnes PJ. (1995) Ann. Med., **27**, 389-393
74. Severina IS, Bussygina O.G., Pyatakova NV, Khropov Yu.V., Krasnoperov RA, (2000) Eur. J. Pharmacol. **407**, 61-64
75. Klayman DL. (1985) Science, **228**, 1049-1055
76. Ambroise-Thomas P. (1999) Bull. Acad. Natl. Med. **183**, 797-810
77. Bennoit-Vical F, Robert A, and Meunier B. (1999) Antimicro Agent Chemother., **43**, 2555-2558
78. Mechnick SR. (1998) Med. Trop., **58**, 13-17
79. Goldberg D., Slater A.F., Cerami A, and Henderson G.B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2931-2935
80. Robert KA, and Meunier B. (1997) J. Am. Chem., **119**, 5968-5969
81. Ignatushchenko MV, Winter RW, Bachinger HP, Hinrichs DJ, and Riscoll MK. (1997) FEBS Lett., **409**, 67-73
82. Atamna H, Krugliak M, Shalmiev G, Deharo E, Pescarmona G, and Ginsburg H. (1996) Biochem. Pharmacol. **51**, 693-700
83. Gruetter CA, Kadowitz PJ, and Ignarro LJ. (1981) Can. J. Physiol. Pharmacol. **59**, 150-156
84. Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamang C, Gautret R, Bussolino F, Ulliers D, Gribaldi G, Dharo E, Gabrielli G, et al (1995) J. Exp. Med., **182**, 677-688
85. Taramelli D, Basilico N, Pagni E, Grande R, Monti D, Chone M, and Olliarom P. (1995) Exp. Parasitol. **81**, 501-511
86. Severina IS, Pyatakova NV, Bussygina O.G., Mikhailitsin, F.S., Khropov, Yu.V., (2002) Eur. J. Pharmacol., **438**, 69-73
87. Schildbach S, Wernsdorfer WH, Suebsaeng L, and Rooney W. (1990) South. Asian J. Med. Public Health **21**, 29-38
88. Charoenpan P, Indrapasit S, Kiatboonsri S, Suvachitanant O, and Tanomsup S. (1990) Chest, **97**, 1190-1197

89. *Bruneel F., Gachot B., Timsit J.F., Wolff M., Bedos J.P., Regnier B., and Vacon F.* (1997) *Intensive Care Med.*, **23**, 698-701
90. *Driscoll W., Thurin S., Carrion V., Stenborn R.H., and Morin F.C.* (1996) *J. Pediatr.*, **129**, 904-908
91. *Drown G., Frankl D., and Phang T.* (1996) *Postgrad Med. J.*, **72**, 612-614

Поступила 21.12.01

NITRIC OXIDE. ROLE OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE IN THE MECHANISM UNDERLYING ITS PHYSIOLOGICAL EFFECTS

I. S. Severina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119992 Russia, fax:(095) 245-0857

In this review the molecular mechanism underlying the antihypertensive and antiaggregatory actions of nitric oxide (NO) are discussed. It has been shown that these effects are directly connected with the activation of soluble guanylate cyclase and the accumulation of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP). The data concerning the basic chemical characteristics of guanylate cyclase, such as the subunits structure, isoforms, modern concepts on the catalytic and regulatory centers of the enzyme are presented. The role of heme and sulfhydryl groups in the functioning of guanylate cyclase and the significance of the nitrosyl-heme complex formed as a result of interaction of guanylate cyclase heme with NO are analyzed. Using new approaches for studying the antihypertensive and antiaggregatory actions of nitric oxide in combination with the newly obtained data on the regulatory role of guanylate cyclase in the platelet aggregation process, the most important results were obtained. The priority data on the new inhibitors of nitric oxide-dependent guanylate cyclase activation (among which turn to be the drugs) and the possible molecular mechanism of their pharmacological action are presented.

Key words: soluble guanylate cyclase.