

УДК 613.632.615.36
©Коллектив авторов

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ЛЕВОМИЦЕТИНОМ, ТЕТРАЦИКЛИНОМ И ОКСОЛИНОМ

А.Ю. Щеголев¹, Т.А. Сидорова², И.С. Северина^{1}*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; факс: (495)245-0857; эл. почта: irina.severina@ibmc.msk.ru

²ГУ онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Исследовано влияние антибиотиков левомицетина и тетрациклина и противовирусного препарата оксолина на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека, на стимуляцию фермента NO-донорами (нитропруссидом натрия (НН) и спермин наноатом (спермин NONO)) и на активацию спермин NONO в присутствии YC-1. Все использованные препараты в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ не влияли на базальную активность гуанилатциклазы, но потенцировали активацию фермента НН. Наибольшее усиление индуцированной НН активации гуанилатциклазы достигалось при 10 мкМ концентрациях исследованных соединений. Все использованные препараты синергично усиливали (аналогично YC-1) активацию растворимой гуанилатциклазы, индуцированную спермин NONO. Однако, в отличие от YC-1, для эффекта которого характерен сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации NO-донора, исследованные соединения подобного действия не оказывали. Более того, использованные соединения не влияли и на сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO в присутствии YC-1. Это свидетельствует об отсутствии конкурентных отношений между YC-1 и использованными лекарственными средствами при взаимодействии с ферментом. Обнаруженный регуляторный феномен синергичного усиления NO-зависимой активации гуанилатциклазы левомицетином, тетрациклином и оксолином может приводить к возникновению дополнительных эффектов, особенно, при продолжительном лечении этими препаратами.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, YC-1, левомицетин, тетрациклин, оксолин, потенцирование активации.

ВВЕДЕНИЕ. Растворимая гуанилатциклаза является основным внутриклеточным рецептором оксида азота (NO), активирующего фермент и усиливающего образование вторичного посредника – циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP) [1, 2]. Последний опосредует широкий спектр различных физиологических функций через взаимодействие со специфическими сGMP-зависимыми протеинкиназами, ионными каналами и фосфодиэстеразой. Этот путь передачи сигналов лежит в основе большого числа физиологических эффектов, приписываемых оксиду азота и являющихся важными в регуляции сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной и иммунной систем [3]. Последствия действия сигнальной системы оксид азота-растворимая гуанилатциклаза-сGMP могут быть фундаментальными для этиологии разнообразных патологических состояний.

* - адресат для переписки

Агенты, которые могут модулировать активность фермента селективным образом, должны обладать значительным терапевтическим потенциалом. Подобные модуляторы активности гуанилатциклазы не только способствовали бы выяснению физиологической значимости этого фермента, но и, что не менее существенно, могли бы использоваться в качестве лекарственных средств. В последнее время в литературе появляется все больше сообщений о вовлечении системы оксид азота – растворимая гуанилатциклаза - cGMP (прямо или косвенно) в механизм терапевтического действия некоторых известных лекарств.

Астма и другие воспалительные процессы в дыхательных путях характеризуются избыточным образованием оксида азота. Это обусловлено экспрессией индуцибельной NO-синтазы, резким повышением активности растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP. В качестве лечебного средства при таких заболеваниях наиболее широко и успешно используется муколитический препарат амброксол (lasolvan). Нами было показано, что амброксол является NO-зависимым ингибитором растворимой гуанилатциклазы [4]. Другие примеры, характеризующие свойства некоторых лекарственных средств, связанных с функционированием сигнальной системы NO - cGMP, можно найти в обзоре [5]. Подобные сведения имеют важное значение для создания новых эффективных лекарственных препаратов, а также для уточнения (а возможно, и пересмотра) существующих представлений о механизме терапевтического действия ряда известных лекарств. Так, нами впервые было показано, что сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP может быть вовлечена в механизм действия таких широко используемых препаратов, как химиотерапевтические средства: метронидазол (1-(2-оксиэтил)-2-метил-имидазол) [6] и антипротозойный препарат – нитазол (5-ацетиламино-5-нитротиазол) [7]. Эти соединения генерируют оксид азота, активируют растворимую гуанилатциклазу и вызывают накопление cGMP [6, 7]. Одновременно, было установлено, что соединения понижают артериальное давление у гипертензивных крыс с выраженным гипотензивным эффектом, характерным для нитросорбитмононитрата. Новые доноры оксида азота, активирующие растворимую гуанилатциклазу, были выявлены в ряду пятичленных гетероциклических соединений, среди которых оказался химиотерапевтический препарат тинидазол (1-(2-этилсульфоэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) [8]. Полученные результаты пока не позволяют пересмотреть принятые в настоящее время механизмы терапевтического действия этих лекарственных средств. Однако, несомненно, что эти данные необходимо принимать во внимание при оценке эффективности противомикробного действия этих лекарств, возможном возникновении побочных эффектов, а также при направленном создании подобных лекарств нового поколения.

В настоящей работе мы исследовали влияние антибиотиков левомецетина и тетрациклина и противовирусного препарата оксолина на сигнальную систему оксид азота - растворимая гуанилатциклаза – cGMP. Перечисленные препараты широко используются в медицинской практике, однако, возможность их действия на сигнальную систему NO - cGMP не изучена.

МЕТОДИКА. В качестве источника растворимой гуанилатциклазы мы использовали тромбоциты человека, которые выделяли из крови здоровых доноров [9]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 mM трис HCl буфере (pH 7,6), содержащим 0,2 mM дитиотрейтол, озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE-78 (Великобритания) в течение 20 с и центрифугировали 1 ч при 150000 g. Супернатант озвученной тромбоцитарной суспензии, полученной из 40 мл крови одного донора, использовали в качестве препарата растворимой гуанилатциклазы в одном эксперименте.

Активность гуанилатциклазы измеряли как описано в работе [10]. Пробы (общий объем 150 мкл) содержали 50 mM трис-HCl буфер (pH 7,6), 1 mM GTP, 4 mM MgCl₂, 4 mM креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 mM теofilлин,

20 мкг супернатанта 105000 g (по белку) и при необходимости другие добавки. 10 мМ концентрация теofilлина была достаточна для полного торможения активности фосфодиэстеразы тромбоцитов человека [9]. Влияние левомецетина, тетрациклина и оксолина исследовали в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ при использовании в качестве NO-донора нитропруссид натрия (НН) и в конечной концентрации 10 мкМ в опытах со спермин NONO. Соединения сначала преинкубировали (7 мин при 2°C) с гуанилатциклазой до добавления NO-донора. При использовании НН концентрация последнего в пробе составляла 10 мкМ; опытах со спермин NONO исследования проводили в диапазоне его концентраций от 1 до 20 мкМ. Из-за плохой растворимости левомецетина, тетрациклина и оксолина в буферном растворе соединения сначала растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) с последующим разведением в 50 мМ трис HCl буфере (pH 7,6) до требуемой концентрации. Контрольные пробы содержали то же количество ДМСО.

Количество образовавшегося с GMP (15 мин, 37°C) определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов для количественного определения cGMP (ООО "Медицина, Аналитика, Ветеринария", Россия). Белок определяли по методу Bradford [11]. Использовали следующие реактивы: натриевая соль cGMP, спермин NONO, YC-1 [3-(5-оксиметил-2-фурил)-1-бензил индазол] ("Sigma", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Левомецетин, тетрациклин и оксолин в диапазоне концентраций 0,1 –10 мкМ не влияли на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека. Базальная активность растворимой гуанилатциклазы без и в присутствии левомецетина, тетрациклина и оксолина (по 10 мкМ) равнялась 107 ± 5 , 89 ± 7 , 103 ± 6 и 111 ± 8 (пмоль cGMP/мг/мин), соответственно. Рисунок 1 показывает, что все исследованные соединения потенцировали активацию гуанилатциклазы НН (10 мкМ). Наибольшее усиление индуцированной НН активации гуанилатциклазы достигалось в присутствии 10 мкМ концентраций левомецетина, тетрациклина или оксолина. Поскольку НН не является прямым донором NO, мы исследовали влияние использованных препаратов в оптимальной (10 мкМ) для каждого соединения концентрации на стимуляцию гуанилатциклазы спермин NONO в диапазоне концентраций последнего от 1 до 20 мкМ. Рисунок 2а показывает, что все использованные соединения синергично усиливали (аналогично YC-1) индуцированную спермин NONO активацию растворимой гуанилатциклазы. Наиболее сильным стимулятором оказался оксолин. Известно, что основным действием YC-1 является повышение чувствительности фермента к NO в присутствии YC-1, что приводит к сдвигу влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации NO-донора. Как видно на рисунке 2б, в случае левомецетина, тетрациклина и оксолина подобного сдвига влево концентрационно зависимой кривой не наблюдалось. Величины EC_{50} (концентрация, вызывающая максимальную стимуляцию активности) для спермин NONO без и в присутствии (по отдельности) левомецетина, тетрациклина и оксолина (по 10 мкМ) равны 6,0, 6,0, 5,5 и 5,0 мкМ, соответственно. Рисунок 3а показывает, что интенсивность синергичного усиления индуцированной спермин NONO активации гуанилатциклазы в присутствии YC-1 (3 мкМ) или YC-1 (3 мкМ) после добавления (по отдельности) левомецетина, тетрациклина и оксолина практически одна и та же; т.е. добавление этих соединений не изменяет величины потенцирующего влияния YC-1 на активацию фермента NO-донором. Эти соединения не влияли и на сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO в присутствии YC-1 (3 мкМ) (см. рис. 3б). Величины EC_{50} для спермин NONO без и в присутствии YC-1 (3 мкМ) равнялись 7,5 и 2,5 мкМ, а при добавлении (по отдельности) левомецетина, тетрациклина и оксолина (по 10 мкМ) эти величины составляли 2,1, 2,2 и 1,6 мкМ, соответственно (рис. 3б).

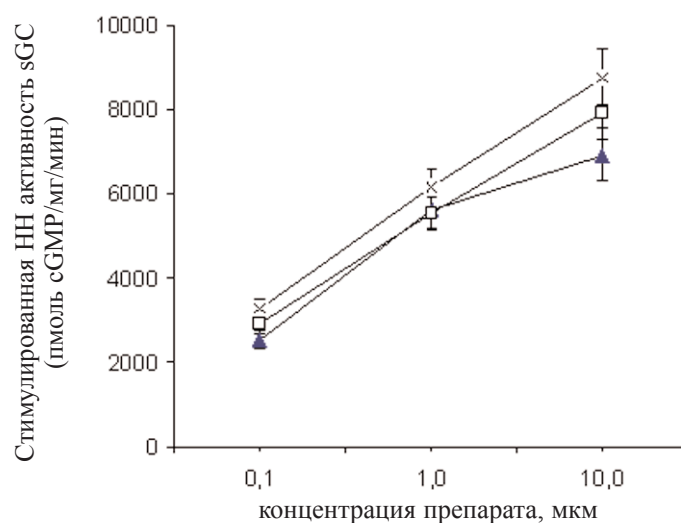


Рисунок 1.

Влияние увеличивающихся концентраций левомицетина, тетрациклина и оксолина на активность растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека, стимулированную нитропруссидом натрия (НН). Стимулированная НН (10 мкМ) активность sGC в присутствии увеличивающихся концентраций левомицетина (▲), тетрациклина (□) и оксолина (x) (по 10 мкМ). Ордината: стимулированная НН (10 мкМ) активность sGC (пмоль cGMP/мг/мин). Абсцисса: концентрации препаратов (левомицетина, тетрациклина или оксолина). Базальная активность равна 107 ± 5 , стимулированная НН (10 мкМ) - 1887 ± 132 пмоль cGMP/мг/мин. Приведены средние значения из 3 независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

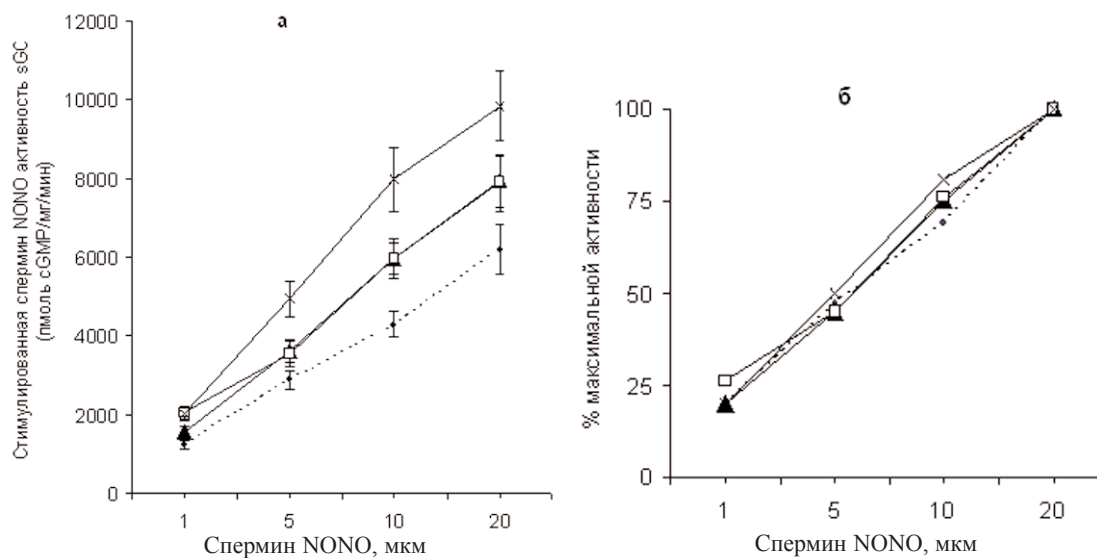


Рисунок 2.

Влияние левомицетина, тетрациклина и оксолина на стимуляцию растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека спермином NONO. **а)** увеличивающиеся концентрации NO-донора спермин NONO в отсутствии (•) и в присутствии левомицетина (▲), тетрациклина (□) и оксолина (x) (по 10 мкМ). Ордината: стимулированная спермином NONO активность sGC (пмоль cGMP/мг/мин). **б)** сравнение величин EC_{50} концентрационно-зависимых кривых индуцированной спермином NONO активации sGC в отсутствии (•) и после добавления левомицетина (▲), тетрациклина (□) и оксолина (x) (по 10 мкМ). Ордината: % максимальной активности. Абсцисса: концентрация спермин NONO в пробе (мкМ). Базальная активность гуанилатциклазы равна 123 ± 10 пмоль cGMP/мг/мин. Приведены средние значения из 3-4 независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

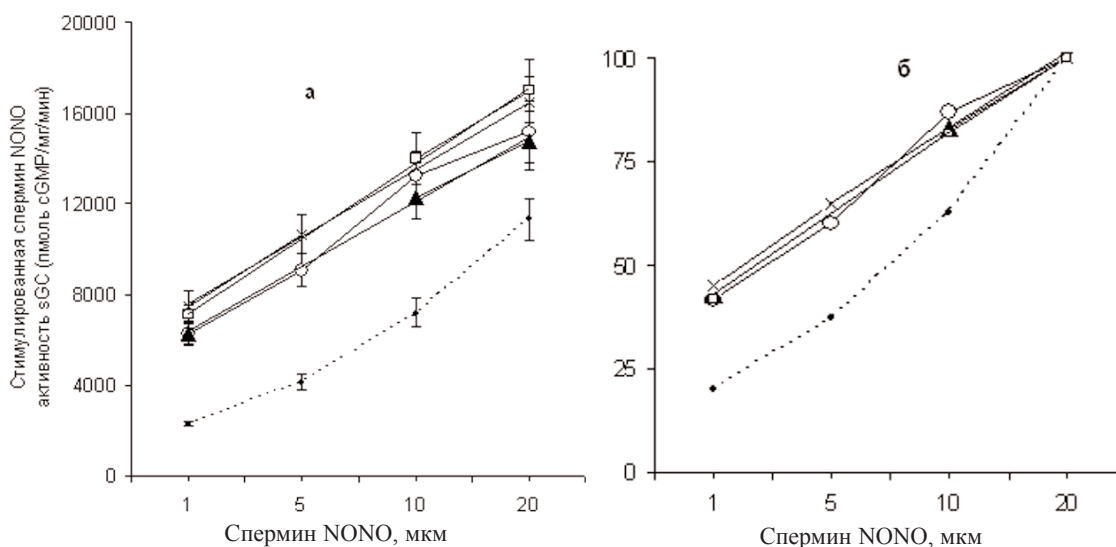


Рисунок 3.

Влияние левомицетина, тетрациклина и оксолина на потенцирование индуцированной спермин NONO стимуляции растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека в присутствии YC-1. **а)** увеличивающиеся концентрации NO-донора спермин NONO в отсутствии (•) и в присутствии 3 мкМ YC-1 (○) или 3 мкМ YC-1 после добавления левомицетина (▲), тетрациклина (□) или оксолина (×) (по 10 мкМ). Ордината: стимулированная спермин NONO активность sGC (пмоль cGMP/ мг/ мин). **б)** изменение величин EC_{50} концентрационно зависимых кривых индуцированной спермин NONO стимуляции sGC в отсутствии (•) и в присутствии 3 мкМ YC-1 (○) или 3 мкМ YC-1 после добавления левомицетина (▲), тетрациклина (□) или оксолина (×) (по 10 мкМ). Ордината: % стимулированной активности. Абсцисса: концентрация спермин NONO в пробе (мкМ). Базальная активность гуанилатциклазы равна 94 ± 8 (пмоль cGMP/мг/ мин). Приведены средние значения из 3 независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

ОБСУЖДЕНИЕ. Левомицетин - синтетический антибиотик широкого спектра действия, идентичный природному антибиотику хлорамфениколу, являющемуся продуктом жизнедеятельности микроорганизма *Streptomyces venezuelae* [12]. Он хорошо проникает в органы и жидкости организма, где и может контактировать с гуанилатциклазой.

Тетрациклин также является антибиотиком широкого спектра действия, относящегося к целой группе тетрациклинов, различающихся между собой по некоторым особенностям антимикробного действия, скорости всасывания и выделения из организма [12]. Тетрациклин является антимикробным веществом, продуцируемым *Streptomyces aureofaciens*, которое быстро проникает во многие органы и ткани организма.

Оксолин обладает противовирусной активностью. Он эффективен при вирусных заболеваниях глаз, кожи, при вирусных ринитах; оказывает также профилактическое действие при гриппе [12].

Все перечисленные препараты различаются по химической структуре, и в литературе нет данных о взаимосвязи соединений с сигнальной системой оксид азота - растворимая гуанилатциклаза - cGMP.

Представленные в настоящей работе данные впервые демонстрируют, что все использованные препараты не влияли на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека, но эффективно стимулировали NO-зависимую активацию фермента, синергично усиливая вызванную спермин NONO активацию гуанилатциклазы. Это свойство аналогично

ПОТЕНЦИРИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ЛЕВОМИЦЕТИНОМ

YC-1 - NO-независимому активатору фермента. Однако, в отличие от YC-1, соединения не вызывали сдвига влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO и не изменяли сдвига влево концентрационно зависимой кривой активации фермента спермин NONO при добавлении YC-1. Другими словами, все использованные препараты не конкурировали с YC-1 при взаимодействии с ферментом. Ранее было постулировано, что механизм, лежащий в основе вызванного YC-1 синергичного усиления активации гуанилатциклазы NO-донорами, основан на связывании YC-1 с аллостерическим центром фермента [13], расположенным в N-концевой части α_1 -субъединицы. Подобное взаимодействие повышает сродство NO к простетической гемовой группе фермента [14] и снижает скорость диссоциации нитрозил-гемового комплекса [15, 16]. Это приводит к увеличению NO-стимулированной активности гуанилатциклазы. Отсутствие конкурентных отношений между YC-1 и использованными препаратами исключает возможность взаимодействия левомецетина, тетрациклина и оксолина (хотя бы частично) с тем же аллостерическим центром фермента, с которым связывается YC-1. Химические структуры использованных препаратов различаются между собой и отличаются от структуры YC-1.

Считается общепринятым, что в основе механизма антибактериального действия левомецетина и тетрациклина лежит подавление ими биосинтеза белка микробной клетки [12]. Обнаруженная в настоящей работе способность этих препаратов синергично усиливать (аналогично YC-1) NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы указывает на новый биохимический эффект этих соединений. Поскольку лечение этими лекарственными средствами, как правило, достаточно продолжительно, можно предположить возникновение дополнительных эффектов, связанных с резким усилением NO-зависимой активации гуанилатциклазы. Последнее необходимо принимать во внимание при оценке эффективности лечебного действия этих препаратов.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-04-48577).

ЛИТЕРАТУРА

1. Waldman S.A., Murad F. (1987) *Pharmacol. Rev.*, **39**, 163-196.
2. Garbers, D.L. Lowe D.S. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 30741-30744.
3. Hobbs A.J. (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 637-640.
4. Severina I.S., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Khropov Yu.V., Krasnoperov R.A. (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **407**, 61-64.
5. Северина И.С. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 19-29.
6. Григорьев Н.Б., Левина В.И., Азизов О.В., Пятакова Н.В., Паршин В.А., Арзамасцев А.П., Северина И.С., Граник В.Г. (2002) *Вопр. биол. мед. фармацевт. химии*, **4**, 10-14.
7. Левина В.И., Азизов О.В., Пятакова Н.В., Северина И.С., Арзамасцев А.П., Григорьев Н.Б. (2002) *Вопр. биол. мед. фармацевт. химии*, **4**, 6-10.
8. Левина В.И., Трухачева Л.А., Пятакова Н.В., Арзамасцев А.П., Северина И.С., Григорьев Н.Б., Граник В.Г. (2004) *Хим. фарм. ж.*, **38**, 15-18.
9. Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Белушкина Н.Н., Северина И.С. (1987) *Биохимия*, **52**, 956-963.
10. Garbers D.S., Murad F. (1979) *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57-67.
11. Bradford H.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
12. Елинов Н.П., Громова Е.Г. (2003) В кн.: *Современные лекарственные препараты*, 3 издание, СПб : Питер, с. 881-882, 884, 808.
13. Liu Y., Rucho A.T., Rao V.D., Hurley J.H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13414-13419.

14. Hoenicka M., Becker E.M., Apeler H., Sirichoke T., Schroder H., Gerzer R., Stasch J.R. (1999) *Mol. Med.*, **77**, 14-23.
15. Kharitonov V.G., Russwurm M., Magde D., Scharma V.S., Koesling D. (1997) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 284-286.
16. Friebe A., Koesling D. (1998) *Mol. Pharmacol.*, **53**, 123-127.

Поступила: 18. 12. 2008.

POTENTIATION OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT ACTIVATION OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE BY LAEVOMYCETIN, TETRACYCLINE AND OXOLIN

A.Yu. Shchegolev¹, T.A. Sidorova², I.S. Severina¹

¹Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (499)245-0857; e-mail: irina.severina@ibms.msk.ru

²Blokhin Cancer Center, Russian Academy of Medical Sciences, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478 Russia.

The influence of antibiotics laevomycetin and tetracycline and the antiviral agent oxolin on the activity of human platelet soluble guanylate cyclase, the stimulation of the enzyme by NO-donors (sodium nitroprusside (SNP) and spermine nanoate (spermine NONO)) and the combination of spermine NONO and YC-1 was investigated. All preparations used in the concentration range 0.1-10 mM had no effect on the basal activity of guanylate cyclase but potentiated the SNP-induced activation of this enzyme. All preparations used synergistically increased (similar to YC-1) spermine NONO-induced activation of soluble guanylate cyclase. At the same time these compounds did not produce the leftward shift of spermine NONO concentration response curve characteristic for YC-1. Moreover, all compounds used did not influence the leftward shift of spermine NONO concentration response curve obtained in the presence of YC-1. This demonstrated that there was no competition between YC-1 and the drugs for interaction with the enzyme. The revealed regulatory phenomenon of laevomycetin, tetracycline and oxolin to increase synergistically NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase may cause additional pharmacological effects during prolonged treatment by these drugs. This fact is necessary taking into account.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxide, laevomycetin, tetracycline, oxolin, potentiation of activation.