

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 613.632.615.36

©Коллектив авторов

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ YC-1, NO-ДОНОРАМИ И УСИЛЕНИЕ СИНЕРГИЧНОГО ЭФФЕКТА YC-1 НА NO-ЗАВИСИМУЮ АКТИВАЦИЮ ФЕРМЕНТА ПРОИЗВОДНЫМИ 1,2,3-(ТРИАЗОЛИЛ)-1,2,5-ОКСАДИАЗОЛА

И.С. Северина^{1}, Н.В. Пятакова¹, А.Ю. Щеголев¹, В.Ю. Рожков²,
Л.В. Батог², Н.Н. Махова²*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; тел.: +7(499)246-69-80; факс: +7(499)245-08-57;
эл. почта: irinok.severina@yandex.ru

²Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН,
119991, Москва, Ленинский проспект, 47; факс: +7(499)135-53-26; эл. почта: mnn@ioc.ac.ru

Исследовано влияние производных 1,2,3-(триазолил)-1,2,5-оксадиазола: (4-амино-3-(5-метил-4-этоксикарбонил-1Н-(1,2,3-триазол-1-ил)-1,2,5-оксадиазол (ТФ₄СН₃) и 4,4'-бис(5-метил-4-этоксикарбонил-1Н-(1,2,3-триазол-1-ил)-3,3'-азо-1,2,5-оксадиазол (2ТФ₄СН₃) на стимуляцию растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека YC-1, NO-донорами (нитропруссидом натрия и спермин наноатом) и на синергичное увеличение NO-зависимой активации фермента в присутствии YC-1. Оба соединения усиливали активацию гуанилатциклазы YC-1, потенцировали стимуляцию фермента NO-донорами и увеличивали синергичный эффект YC-1 на NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Обсуждается аналогия в свойствах исследованных производных 1,2,3-триазолил-1,2,5-оксадиазола с YC-1 и возможный механизм, лежащий в основе выявленных свойств изученных соединений.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, YC-1, производные 1,2,3-триазол-1-ил-1,2,5-оксадиазола

DOI: 10.18097/PBMC20156106705

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенный оксид азота (NO), образующийся из L-аргинина под действием L-аргинин-NO-синтазы, является ключевой сигнальной молекулой, участвующей в регуляции различных биохимических и физиологических процессов в живых организмах [1]. Основным физиологическим рецептором эндогенного оксида азота является растворимая гуанилатциклаза (КФ 4.6.1.2), катализирующая биосинтез циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP). Последний является вторичным посредником, мощным регулятором метаболизма клетки в значительной степени определяющей её функции [2].

Эндогенный NO, идентичный эндотелиальному фактору релаксации (ЭДФР), рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилатор. NO активирует гуанилатциклазу при взаимодействии

с гемом фермента [3] и усиливает образование сGMP. Последний опосредует широкий спектр физиологических функций через взаимодействие со специфическими сGMP-зависимыми протеинкиназами [4], ионными каналами и фосфодиэстеразой [5]. Этот путь передачи сигналов реализует большинство физиологических функций, приписываемых сигнальной системе NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP, которая является важной для этиологии различных патологических состояний [6]. Агенты, которые могут селективным образом модулировать активность фермента, должны обладать значительным терапевтическим потенциалом [7].

Органические нитраты (нитроглицерин и др.) используются при лечении таких заболеваний как стенокардия, тяжёлые формы сердечной недостаточности уже более ста лет. Однако, молекулярный механизм действия этих соединений

* - адресат для переписки

был установлен только в конце 70-х годов прошлого века, когда было обнаружено, что в результате их метаболизма образуется оксид азота, а механизм, лежащий в основе терапевтического действия органических нитратов, аналогичен вазодилаторному действию эндогенного NO. Большое число нежелательных побочных эффектов, возникающих при длительном применении используемых NO-доноров (в основном нитровазодилаторов), в том числе развитие толерантности, привлекло внимание исследователей к соединениям, способным активировать гуанилатциклазу по NO-независимому механизму и потому не вызывающих развития толерантности. Первым NO-независимым активатором гуанилатциклазы было производное бензил индазола: 3-(5-оксиметил-2-фурил)-1-бензил индазол, известное как YC-1 [8]. YC-1 обладает гипотензивным и антиагрегантным действием [9]. Это соединение не только активирует растворимую гуанилатциклазу, но также и потенцирует и синергично увеличивает стимуляцию гуанилатциклазы NO-донорами [10, 11]. Поэтому, создание соединений, обладающих действием аналогичным YC-1, становится особенно важным и может способствовать развитию новых, более эффективных сердечно-сосудистых препаратов.

В настоящей работе мы впервые исследовали два новых соединения, являющихся производными 1H-(1,2,3-триазол-1-ил)-1,2,5-оксадиазола – TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$. Эти соединения близки по структуре к YC-1. Потому, представляло особый интерес сравнить действие этих соединений с влиянием YC-1 на функционирование сигнальной системы NO-cGMP. Задачей исследования было изучить влияние TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ на стимуляцию растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека YC-1, донорами NO (нитропруссидом натрия (SNP) и спермин NONO) и на синергичное увеличение NO-зависимой активации фермента в присутствии YC-1.

МЕТОДИКА

В качестве источника растворимой гуанилатциклазы использовали тромбоциты человека. Тромбоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров мужского пола (в возрасте от 20 до 40 лет) как описано ранее [12]. Все доноры дали информированное согласие на использование крови в данных экспериментах. Суспензию промытых тромбоцитов в 50 mM Трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащую 0,2 mM дитиотрейтол, озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Великобритания) 20 с при 2°C и центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч. Супернатант озвученной суспензии тромбоцитов, полученной из 40 мл крови от одного донора, использовали в качестве источника растворимой гуанилатциклазы в одном эксперименте.

Активность гуанилатциклазы определяли согласно [13]. Пробы (конечный объем 150 мкл) содержали 50 mM Трис-HCl буфер (pH 7,6), 1 mM GTP,

4 mM креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 mM теofilлин, 20 мкг супернатанта 105000 g (по белку) и другие добавки при необходимости. 10 mM концентрация теofilлина была достаточной для полного торможения активности фосфодиэстеразы тромбоцитов человека [12]. Нитропруссид натрия (SNP) использовали в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ. YC-1 исследовали в конечной концентрации 3 мкМ. Эта концентрация вызывала наибольший потенцирующий эффект индуцированной SNP (10 мкМ) стимуляции активности растворимой гуанилатциклазы. При больших концентрациях YC-1 (при 50 или 200 мкМ), потенцирующий эффект YC-1 отсутствовал. Мы показали, что стимулированная нитропруссидом натрия (в диапазоне его концентраций от 1 до 100 мкМ) активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека в присутствии 50 или 200 мкМ YC-1 была меньше арифметической суммы отдельных активностей. Поэтому, мы не исследовали влияние больших (чем 3 мкМ) концентраций YC-1 на стимуляцию фермента NO-донорами. Влияние TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ изучали при 10 мкМ концентрации. Сравнение эффектов TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ при различных концентрациях (1, 5 и 10 мкМ) показало, что наибольшее увеличение активации растворимой гуанилатциклазы, индуцированной SNP (10 мкМ) – было достигнуто при 10 мкМ исследуемых соединений. Соединения сначала преинкубировали (7 мин, при 4°C) с гуанилатциклазой, затем, в экспериментах с YC-1, дополнительно преинкубировали (7 мин, при 4°C) с YC-1 до добавления NO-донора.

Количество образовавшегося (15 мин 37°C) cGMP определяли иммуноферментным (ELISA) методом с использованием наборов реактивов для количественного определения cGMP (Медицина. Аналитика. Ветеринария. Россия). Белок определяли методом Бредфорд [14]. Все реагенты высокой степени чистоты были фирмы "Sigma" (США).

Синтез TF_4CH_3 – 4-амино-3-(5-метил-4-этоксикарбонил-(1H-1,2,3-триазол-1-ил)-1,2,5-оксадиазол – был осуществлен путём кипячения 4-амино-3-азидо-1,2,5-оксадиазола с этилацетатом в MeOH в присутствии Mg CO_3 [15]. $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ – 4,4'-бис(5-метил-4-этоксикарбонил-(1H-1,2,3-триазол-1-ил)-3,3'-азо-1,2,5-оксадиазол был синтезирован путем окисления TF_4CH_3 дихлоризоциануратом натрия в 50% уксусной кислоте при комнатной температуре [16]. Чистоту TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ устанавливали на основании данных элементного анализа и спектральных характеристик: IR, NMR¹H, ¹³C-спектроскопии и масс-спектроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Химические структуры TF_4CH_3 , $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ и YC-1, приведённые на рисунке 1, демонстрируют структурную аналогию; все соединения представляют собой азот-кислород содержащие гетероциклы, связанные друг с другом C-N связью.

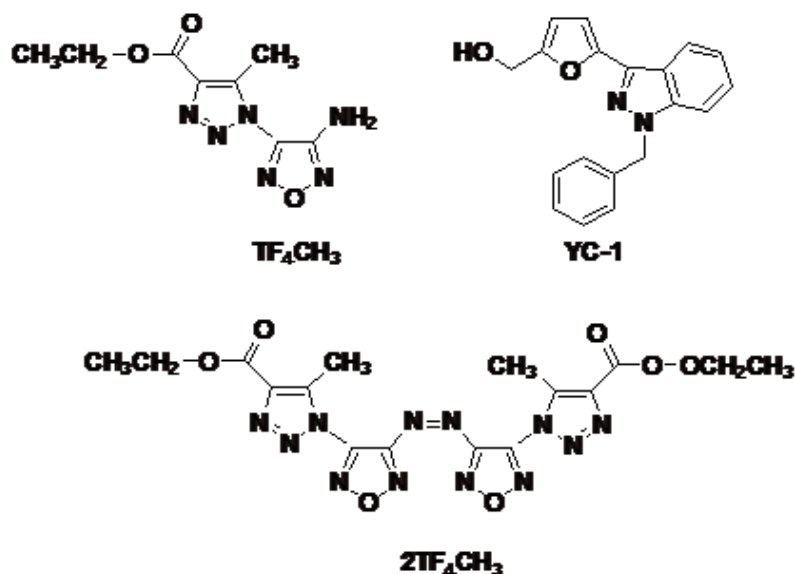


Рисунок 1. Структуры соединений, исследованных в работе.

ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ активируют гуанилатциклазу слабее, чем YC-1. Таблица 1 показывает, что активация гуанилатциклазы YC-1 (3 мкМ) составляла 309±25%, тогда как активация фермента ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ (по 10 мкМ) была равна 133±13 или 198±25%, соответственно. Таблица 1 также показывает, что активация растворимой гуанилатциклазы YC-1 резко увеличивалась, если YC-1 добавляли в пробу после преинкубации фермента с ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ (7 мин, 2°C); это увеличение составляло 707±36% или 745±38%, соответственно (табл. 1). Рисунок 2 показывает, что потенцирование индуцированной нитропруссидом натрия активации гуанилатциклазы ТФ₄СН₃ было слабее, чем у YC-1, тогда как при использовании 2ТФ₄СН₃ активация была того же порядка, что и в опытах с YC-1. Известно, что синергичное усиление активации растворимой гуанилатциклазы NO-донорами в присутствии YC-1 ассоциируется с увеличением сродства гема фермента к NO [17] и ингибированием диссоциации нитрозил-гемового комплекса [18]. Это вызывает сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации NO-донора и снижение величины EC₅₀ (концентрация, равная половине, вызывающей наибольшее стимулирование активности). Аналогичный сдвиг влево соответствующей кривой наблюдался

и в экспериментах с ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ (см. рис. 2). Таблица 2 показывает, что величина EC₅₀ снижалась с 5,1±0,32 мкМ (без YC-1) до 3,0±0,56 мкМ, а в присутствии ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ – до 3,0±0,65 и 3,2±0,51 мкМ, соответственно (p<0,002). Рисунок 2 также показывает, что оба соединения интенсифицируют увеличение индуцированной SNP активации растворимой гуанилатциклазы в присутствии YC-1. Однако, данные таблицы 2 показывают, что добавление ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ не влияло на величину EC₅₀ активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия в присутствии YC-1. Эта величина EC₅₀ с YC-1 (3,0±0,56 мкМ) незначительно изменялась после добавления ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ (2,7±0,65 и 3,1±0,25 мкМ), соответственно. Эти данные показывают отсутствие конкуренции между YC-1 и использованными соединениями.

Поскольку SNP не является прямым донором NO, мы исследовали влияние ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ (по 10 мкМ) на активацию гуанилатциклазы спермин NONO в диапазоне концентрации последнего от 1 до 20 мкМ. Рисунок 3 показывает, что оба соединения потенцируют индуцированную-спермин NONO активацию гуанилатциклазы. Как и в экспериментах с SNP потенцирующий эффект ТФ₄СН₃ был слабее, чем у YC-1, а эффект 2ТФ₄СН₃

Таблица 1. Влияние YC-1, ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека (sGC) и стимуляцию фермента YC-1.

Добавки	Стимулированная активность sGC (пмоль cGMP/мин/мг)	Активация (%)
YC-1 (3 мкМ)	130±8	309±25
ТФ ₄ СН ₃ (10 мкМ)	56±5	133±13
2ТФ ₄ СН ₃ (10 мкМ)	83±7	198±20
YC-1 (3 мкМ) + ТФ ₄ СН ₃ (10 мкМ)	297±20	707±36
YC-1 (3 мкМ) + 2ТФ ₄ СН ₃ (10 мкМ)	313±29	745±38

Примечание. Базальная активность sGC равна 42±4 пмоль cGMP/мин/мг белка. Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов (± стандартные отклонения).

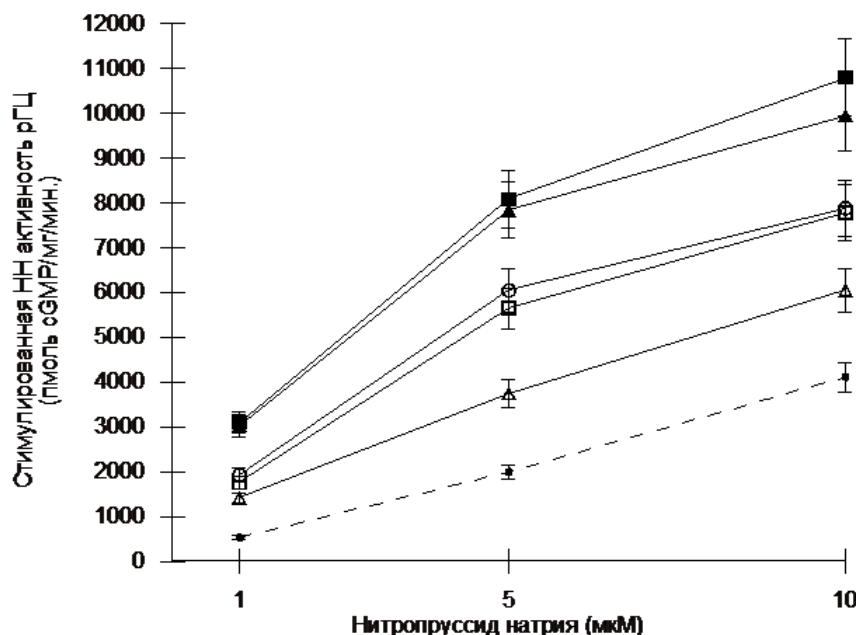


Рисунок 2. Влияние ТФ₄СН₃ и 2ТФ₄СН₃ на стимуляцию растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека нитропруссидом натрия (SNP) и на потенцирование индуцированной-SNP активации фермента в присутствии YC-1. Увеличивающиеся концентрации NO-донора (SNP) в отсутствии (●) и в присутствии (по отдельности) YC-1 (3 мкМ) (○), ТФ₄СН₃ (△) и 2ТФ₄СН₃ (□) (по 10 мкМ) или 3 мкМ YC-1 после добавления ТФ₄СН₃ (▲) или 2ТФ₄СН₃ (■) (по 10 мкМ). Ордината: стимулированная SNP активность sGC (пмоль сGMP/мин/мг белка). Абсцисса: концентрация SNP (мкМ). Базальная активность равна 65±5 пмоль сGMP/мин/мг. Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов (± стандартные отклонения).

Таблица 2. Сравнение величин EC₅₀ индуцированной SNP-стимуляции активности растворимой гуанилатциклазы (sGC) в отсутствии и присутствии (добавленных по отдельности) YC-1 (3 мкМ), ТФ₄СН₃, 2ТФ₄СН₃ (по 10 мкМ каждого) или 3 мкМ YC-1 после добавления ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ (по 10 мкМ).

Добавки	SNP (10 мкМ)					
	-	+ YC-1	+ ТФ ₄ СН ₃	+ 2ТФ ₄ СН ₃	+ YC-1 + ТФ ₄ СН ₃	+ YC-1 + 2ТФ ₄ СН ₃
EC ₅₀ (мкМ)	5,1±0,32	3,0±0,56*	3,0±0,65*	3,2±0,5*	2,7±0,65*	3,1±0,25*

Примечание. Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов (± стандартные отклонения).

* - p<0,002 по отношению к контролю.

был того же порядка, что и в опытах с YC-1 (см. рис. 3). Оба соединения вызвали сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO и снижение величины EC₅₀. Таблица 3 показывает, что величины EC₅₀ индуцированной спермин NONO стимуляции ферментативной активности в отсутствии и в присутствии (добавленных по отдельности) YC-1 (3 мкМ), ТФ₄СН₃ или 2ТФ₄СН₃ (по 10 мкМ) составляли 2,8±0,68, 0,8±0,002, 0,84±0,042 и 0,82±0,031 мкМ, соответственно. Можно видеть (см. рис. 2), что увеличение синергичного эффекта YC-1 на индуцированную спермин NONO активацию фермента более выражено после добавления в пробу 2ТФ₄СН₃. ТФ₄СН₃ не влиял на величину синергичного эффекта YC-1 (см. рис. 3). Величина EC₅₀ индуцированной-спермин NONO активации гуанилатциклазы в присутствии YC-1 (0,80±0,002 мкМ) осталась неизменной после добавления ТФ₄СН₃ (0,84±0,008 мкМ) или 2ТФ₄СН₃ (0,84±0,04 мкМ). Те же результаты были получены и в опытах с SNP.

2ТФ₄СН₃ более эффективен в потенцировании синергичного увеличения NO-зависимой активации фермента в присутствии YC-1, чем ТФ₄СН₃. Это различие не зависело от природы NO-донора (рис. 4а и 4б). Однако, увеличение индуцированного YC-1 усиления NO-зависимой активации фермента NO-донорами обоими соединениями было более выражено в экспериментах с SNP, особенно при его низкой (1 мкМ) концентрации (см. рис. 4а). В опытах со спермин NONO величина индуцированного YC-1 синергичного увеличения NO-зависимой активации гуанилатциклазы в присутствии 2ТФ₄СН₃ не зависела от концентрации NO-донора (1, 5 или 20 мкМ) (см. рис. 4б). Таким образом, эффект производных 1,2,3-(триазолил)-1,2,5-оксадиазола на активацию растворимой гуанилатциклазы YC-1, NO-донорами и на синергичное увеличение NO-зависимой активации фермента в присутствии YC-1, не зависел от природы использованного NO-донора.

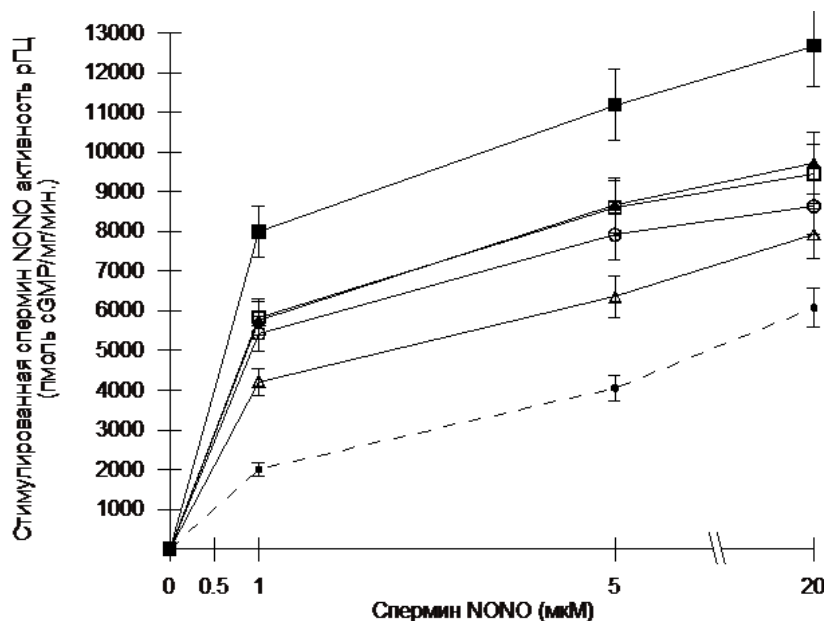


Рисунок 3. Влияние $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ и $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ на активацию растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека спермин NONO и на потенцирование индуцированной- спермин NONO активации фермента в присутствии YC-1. Увеличивающиеся концентрации NO-донора (спермин NONO) в отсутствии (●) и в присутствии (по отдельности) YC-1 (3 мкМ) (○), $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (△) и $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (□) (по 10 мкМ) или 3 мкМ YC-1 после добавления $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (▲) или $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (■) (по 10 мкМ). Ордината: стимулированная спермин NONO активность sGC (пмоль сGMP/мин/мг). Абсцисса: концентрация спермин NONO (мкМ). Базальная активность равна 42 ± 4 (пмоль сGMP/мин/мг). Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

Таблица 3. Сравнение величин EC_{50} индуцированной спермин NONO стимуляции активности растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека в отсутствии и присутствии (добавленных по отдельности) YC-1 (3 мкМ), $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$, $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (по 10 мкМ каждого) или 3 мкМ YC-1 после добавления $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ или $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (по 10 мкМ).

Добавки	Спермин NONO (20 мкМ)					
	-	+ YC-1	+ $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$	+ $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$	+ YC-1 + $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$	+ YC-1 + $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$
EC_{50} (мкМ)	$2,8 \pm 0,68$	$0,8 \pm 0,002^*$	$0,84 \pm 0,042^*$	$0,82 \pm 0,031^*$	$0,84 \pm 0,008^*$	$0,84 \pm 0,04^*$

Примечание. Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

* - $p < 0,002$ по отношению к контролю.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в настоящей работе данные впервые показывают, что активация растворимой гуанилатциклазы YC-1 резко увеличивалась если YC-1 добавляли в пробу после инкубации фермента с $\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (2,3 раза) или $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ (2,4 раза) (табл. 1). Механизм активации растворимой гуанилатциклазы YC-1 не выяснен. Известно, что растворимая гуанилатциклаза является гетеродимером, состоящим из двух субъединиц α и β [19]. Ассоциация С-концевых остатков α и β субъединиц приводит к образованию GMP-(субстрат)связывающего “кармана”, тогда как второй карман псевдосимметричный субстрат-связывающему центру, выполняет аллостерические функции и ответственен за связывание YC-1 [20]. Принято считать, что YC-1 взаимодействует с двумя центрами гуанилатциклазы: аллостерическим и каталитическим, расположенными в непосредственной близости друг от друга [21]. Связывание YC-1 с гуанилатциклазой происходит за счёт взаимодействия гидрофобной части молекулы YC-1 с протопорфириновым кольцом гема или

с гидрофобными остатками гемового “кармана”. Поскольку аллостерический центр, ответственный за связывание YC-1, расположен в непосредственной близости от гем-связывающего домена взаимодействие YC-1 с гуанилатциклазой может вызвать структурные изменения в гемовом “кармане” по аналогии с теми, которые происходят при связывании NO с гемом. Возникшие конформационные изменения повышают сродство фермента к NO, объясняют изменения в скорости констант диссоциаций активаторов [22]; то есть являются причиной возникновения тех эффектов, которые характерны для действия YC-1. Представленные данные показывают, что исследованные соединения ($\text{ТФ}_4\text{СН}_3$ и $2\text{ТФ}_4\text{СН}_3$) синергично усиливали NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы (см. рис. 2 и 3), вызывали сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации NO-доноров и снижали соответствующие величины EC_{50} (см. табл.1 и 2); то есть действие этих соединений сопоставимо с YC-1. Однако, оба соединения не конкурировали с YC-1, что позволяет допустить независимость их действия

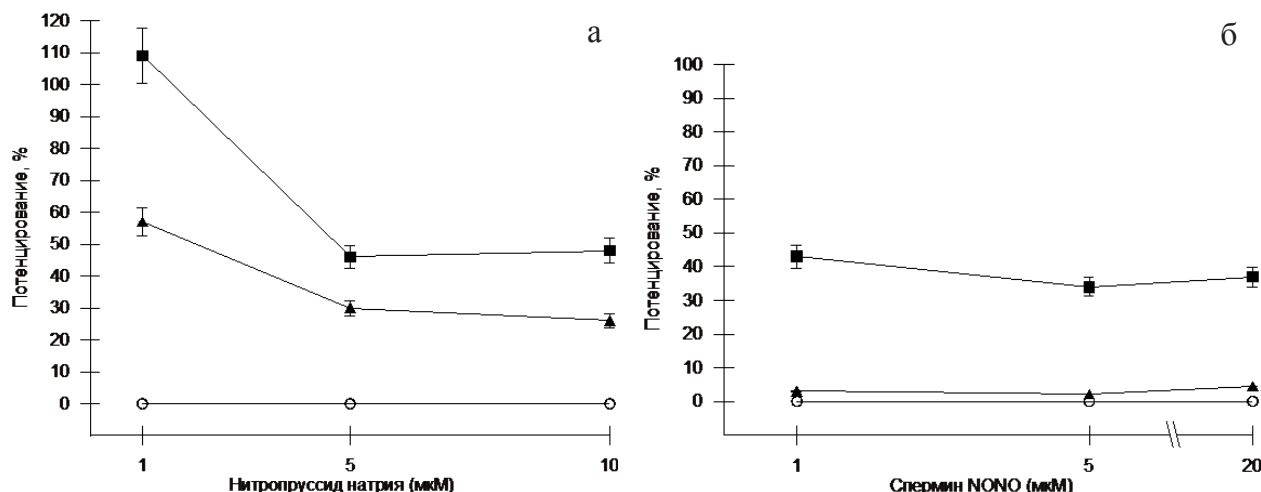


Рисунок 4. Сопоставления влияния TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ на потенцирование синергизма NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы (sGC) тромбоцитов человека в присутствии YC-1 в зависимости от использованного NO-донора. **а)** синергизм индуцированной-SNP активации sGC в присутствии 3 мкМ YC-1 принят за 100% (○) или 3 мкМ YC-1 после добавления TF_4CH_3 (▲) или $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ (□) (по 10 мкМ). Величины стимулированных SNP активностей sGC в присутствии YC-1 (см. рис. 2). **б)** синергизм индуцированной спермин NONO активации sGC в присутствии 3 мкМ YC-1 принят за 100% (○) или 3 мкМ YC-1 после добавления TF_4CH_3 (▲) или $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ (□) (по 10 мкМ). Величины стимулированных спермин NONO активностей sGC в присутствии 3 мкМ YC-1 (см. рис. 3).

от YC-1. Можно предположить, что причиной этого является гидрофобность молекул TF_4CH_3 и $2\text{TF}_4\text{CH}_3$, возможность их взаимодействия с различными участками фермента и аналогия по действию с YC-1. Особый интерес представляют данные, демонстрирующие способность соединений повышать активацию гуанилатциклазы YC-1 (см. табл. 1) и усиливать синергичный эффект YC-1 на стимуляцию фермента NO-донорами (см. рис. 4а и 4б). Химические структуры использованных соединений позволяют предположить наличие дополнительного сайта на молекуле гуанилатциклазы, который взаимодействует с остатками триазола и оксадиазола и вызывает конформационные изменения в аллостерическом центре, ответственным за связывание YC-1; это приводит к усилению активации фермента YC-1 и увеличению синергичного эффекта YC-1 на стимуляцию гуанилатциклазы NO-донорами. Более выраженное действие $2\text{TF}_4\text{CH}_3$ (по сравнению с TF_4CH_3) может быть связано с большей протяженностью его молекулы и потому способностью взаимодействовать с большим количеством групп полипептидной цепи, участвующих в связывании с этим лигандом.

Таким образом, представленные в настоящей работе данные о свойствах производных (1Н-1,2,3-триазол-1-ил)-1,2,5-оксадиазола, позволяют считать представителей этого класса соединений перспективными для дальнейшего изучения их в качестве NO-независимых активаторов растворимой гуанилатциклазы. Мы полагаем, что полученные нами результаты будут способствовать созданию на их основе новых, эффективных сердечно-сосудистых препаратов.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

- Moncada S., Higgs E.A. (1995) FASEB J., **9**, 1319-1330.
- Lucas K.A., Pitari G.M., Kaseronian S., Ruitz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K.P., Waldman S.A. (2000) Pharmacol. Rev., **52**, 376-413.
- Ballou D.P., Zhao Y., Brandish P.E., Marletta M.A. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 12097-12101.
- Kotz A.Y., Martin E., Sharina I.G., Murad F. (2009) Handbook Exp. Pharmacol., **191**, 1-14.
- Russwurm M., Koesling D. (2004) EMBO J., **23**, 4443-4450.
- Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. (2002) Circ. Res., **90**, 21-26.
- Stasch J.P., Hobbs A.J. (2009) Handbook Exp. Pharmacol., **191**, 277-308.
- Ko F.N., Wu C.C., Kuo S.C., Lee F.Y., Teng C.M. (1994) Blood, **84**, 4226-4233.
- Mulsch A., Bauersachs J., Schafer A., Stasch J.P., Kast R., Busse R. (1997) Br. J. Pharmacol., **120**, 681-689.
- Schmidt K., Schrammel A., Koesling D. (2001) Molec. Pharmacol., **59**, 220-224.
- Bellamy T., Cartwaite J. (2002) Br. J. Pharmacol., **136**, 95-103.
- Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Белишук Н.Н., Северина И.С. (1987) Биохимия, **52**, 956-963.
- Garbers D.S., Murad F. (1979) Adv. Cycl. Nucl. Res., **10**, 57-67.
- Bradford H.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
- Батог Л.В., Рожков В.Ю., Стручкова М.И. (2002) Mendeleev Commn., 159-162.

16. Батог Л.В., Константинова Л.С., Рожков В.Ю. (2005) Изв. Акад. Наук сер. химическая, **54**, 1859-1866.
17. Russwurm M, Mergia M., Koesling D. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 24883-24888.
18. Behrends S. (2003) Current Medical Chem., **10**, 291-301.
19. Koglin M., Behrends S. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 12590-12597.
20. Lamothe M., Chang Fu-Jung, Balashova N., Shirokov R., Beuve A. (2004) Biochemistry, **43**, 3039-3048.
21. Yazawa S., Tsuchiya H., Hori H., Makine R. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 21763-21770.
22. Martin E., Lee Yu-Chen., Murad F. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 12938-12942.

Поступила: 17. 02. 2013.

POTENTIATION OF ACTIVATION OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE BY YC-1, NO-DONORS AND INCREASE OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF YC-1 ON NO-DEPENDENT ACTIVATION OF THE ENZYME BY 1,2,3-TRIAZOLYL-1,2,5-OXADIAZOLE DERIVATIVES

I.S. Severina¹, N.V. Pyatakova¹, A.Yu. Shchegolev¹, V.Yu. Rozhkov², L.V. Batog², N.N. Makhova²

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)246-69-80; fax: +7(499)245-08-57;
e-mail: irinok.severina@yandex.ru

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
47 Leninsky av., Moscow, 119991 Russia; e-mail: mnn@ioc.ac.ru

The influence of (1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole derivatives: 4-amino-3-(5-methyl-4-ethoxycarbonyl-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole (TF₄CH₃) and 4,4'-bis(5-methyl-4-ethoxycarbonyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3,3'-azo-1,2,5-oxadiazole (2TF₄CH₃) on stimulation of human platelet soluble guanylate cyclase by YC-1, NO-donors (sodium nitroprusside, SNP, and spermine NONO) and on a synergistic increase of NO-dependent enzyme activation in the presence of YC-1 has been investigated. Both compounds increased guanylate cyclase activation by YC-1, potentiated guanylate cyclase stimulation by NO-donors and increased the synergistic effect of YC-1 on NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase. The similarity in the properties of the examined TF₄CH₃ and 2TF₄CH₃ with that of YC-1 and the possible mechanism underlying the revealed properties of compounds used are discussed.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxidt, YC-1, (1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole derivatives