

УДК 577.152.6
©Северина

NO: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СТАРЫХ ЛЕКАРСТВ.

Северина И.С.

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН
Погодинская ул. д. 10 Москва 119121; факс: (095) 245-0857

Рассмотрены основные подходы к созданию новых эффективных терапевтических средств направленно регулирующих сигнальную систему: оксид азота (NO) - растворимая гуанилатциклаза - циклический гуанозинмонофосфат (сGMP). Особое внимание уделено изучению роли этой системы в механизмах действия "старых лекарств". На основании использованных новых подходов в изучении антигипертензивного и антиагрегантного действия NO и роли гуанилатциклазы в этих процессах 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 оригинальными донорами NO выявлены новые активаторы этого фермента, участвующие в регуляции гемостаза и тонуса сосудов. Представлены данные о новых ингибиторах NO-зависимой активации гуанилатциклазы (среди которых оказались лекарственные препараты) и возможном молекулярном механизме их фармакологического действия. Впервые показано, что сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - сGMP может быть вовлечена в механизм терапевтического действия ряда широко используемых старых лекарств: химиотерапевтических средств и антипротозойные препараты.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, активаторы, ингибиторы

Установление эндогенной природы оксида азота (NO), оказавшегося идентичным эндотелиальному фактору релаксации (ЭДФР), - это одно из наиболее ярких открытий последних лет, имеющих фундаментальное значение и позволившее по-новому подойти к пониманию молекулярного механизма ряда физиологических процессов в клетке. Эндогенный NO образуется из L-аргинина за счет окисления аминогруппы гуанидинового фрагмента под действием L-аргинин-NO-синтазы [1]. Большинство эффектов оксида азота осуществляется через стимуляцию растворимой гуанилатциклазы, катализирующей биосинтез циклического гуанозин-3',5'-монофосфата (сGMP) - вторичного мессенджера, мощного регулятора метаболизма клетки в значительной степени определяющего ее функции [2]

Растворимая гуанилатциклаза является гетеродимером, состоящим из двух иммунологически различных субъединиц, обозначенных как α и β . Фермент является основным внутриклеточным рецептором оксида азота. N-концевая часть каждой субъединицы содержит связывающий гем домен. Именно гем отвечает за чувствительность фермента к NO [3, 4]. Гем-дефицитная гуанилатциклаза не может активироваться оксидом азота [5] до тех, пор пока гем не введен в молекулу фермента; гем-реконструированная гуанилатциклаза активируется NO [6]. При активации гуанилатциклазы NO последний взаимодействует с Fe^{2+} гема с

образованием нитрозил-гемового комплекса [5]. 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 [7]. 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. Активация гуанилатциклазы повышает уровень cGMP - вторичного посредника, который в свою очередь определяет различные стороны функции клетки через взаимодействие со специфическими киназами, с ионными каналами и фосфодиэстеразой [8, 9]. Этот путь передачи сигналов лежит в основе большого числа физиологических действий, приписываемых NO и являющихся важными в регуляции сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем. Эндогенный NO является нейротрансмиттером [10], цитотоксическим агентом [11], мощным фактором гемостаза. Оксид азота ингибирует агрегацию тромбоцитов [12] и рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилатор. Антигипертензивные и антиагрегантные свойства NO непосредственно связаны с активацией растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP.

Метаболические последствия действия зависящей от растворимой гуанилатциклазы сигнальной системы могут иметь важное значение для этиологии разнообразных патологических состояний; агенты, которые могут модулировать активность этого фермента селективным образом, должны обладать значительным терапевтическим потенциалом.

Настоящий обзор посвящен рассмотрению основных подходов к созданию новых эффективных терапевтических средств на основе изучения механизмов регуляции сигнальной системы: NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP, а также выяснению роли этой системы в механизмах действия уже используемых лекарственных препаратов.

Органические нитраты (нитроглицерин, изосорбитдинитрат) используются уже более века при лечении таких заболеваний как стенокардия, сердечная недостаточность [13]. Однако, механизм действия этих соединений был установлен только в конце 1970 годов, когда было обнаружено, что в результате их метаболизма образуется NO, активирующий растворимую гуанилатциклазу. Это приводит к накоплению cGMP, который активирует cGMP -зависимую протеинкиназу, а также Ca^{2+} - АТФазу, способствующих выходу Ca^{2+} из мышечных волокон, дефосфорилированию легких цепей миозина и в конечном итоге вазодилатации [14]. Физиологичность действия органических нитратов привлекла к себе пристальное внимание исследователей. Усилия многих ученых во всем мире были направлены на синтез соединений, которые могли бы стать источником NO при введении в живой организм и таким образом оказаться эффективными вазодилаторами. Задача синтеза новых доноров NO и выявление среди них активаторов гуанилатциклазы представлялась нам перспективной для решения одной из наиболее фундаментальных проблем современной биологической и медицинской химии - направленному поиску и синтезу эффективных антигипертензивных препаратов на основе изучения влияния NO -генерирующих соединений на растворимую гуанилатциклазу.

Нами были исследованы различные классы химических соединений, способных генерировать оксид азота. Изучалась взаимосвязь между химическим строением соединений, их способностью генерировать NO, активировать растворимую гуанилатциклазу и проявлять спазмолитическое действие (на изолированных кольцах грудной аорты крысы) и гипотензивный эффект (на наркотизированных уретаном спонтанно-гипертензивных крысах). Исследовались также антиагрегантные свойства соединений: способность ингибировать ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека [15] и ускорять дезагрегацию

агрегированных тромбоцитов [15]. Полученные результаты показали, что внутри каждого класса то соединение, которое являлось наиболее эффективным донором оксида азота, наиболее сильно активировало гуанилатциклазу и проявляло наиболее выраженные 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 (см. обзор [16]).

Используя эти подходы, нами было изучено соединение - производное фуросана, конденсированное с пиридазин-ди-N-оксидом: 4,7-диметил-1,2,5-оксодиазол [3,4-d] пиридазин-1,5,6-триоксид, которое оказалось донором оксида азота, активатором растворимой гуанилатциклазы, проявляло антигипертензивный и антиагрегантный эффекты. Соединение было предложено использовать в клинике в качестве сосудорасширяющего, гипотензивного, спазмолитического, антиангинального средства и ингибитора агрегации тромбоцитов для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы (по результатам исследований получен патент РФ [17]).

Несмотря на накопленное достаточно большое число активаторов гуанилатциклазы, относящихся к донорам оксида азота, поиск новых доноров NO, которые могли бы избирательно стимулировать активность этого фермента, продолжается. В то же время, в последние годы стали высказываться опасения, что использование в дальнейшем лекарств, аналогичных органическим нитратам и другим NO-донорам или нитровазодилаторам, которые высвобождают эндогенный NO для активации растворимой гуанилатциклазы, является проблематичным. Во-первых, это связано с тем, что использование NO-доноров, в основном органических нитратов, связано с развитием толерантности при их продолжительном употреблении. Механизм, лежащий в основе этой толерантности, остается невыясненным, но он может быть связан со сниженной метаболической активностью этих соединений [18], с избыточным уровнем супероксида, эндотелина или ангиотензина II [19], или со снижением чувствительности /активности рецептора NO - растворимой гуанилатциклазы [20]. Во-вторых, использование NO-доноров *in vivo* связано с неспецифическим взаимодействием NO с другими биологическими молекулами; такие реакции трудно контролировать благодаря спонтанному освобождению NO из нитровазодилаторов и его свободной диффузии в биологических системах. В связи с этим создание соединений, способных активировать гуанилатциклазу по NO-независимому механизму, не обладающих толерантностью, представляло бы значительный интерес и могло бы способствовать появлению новых, более эффективных современных терапевтических средств.

Серия подобных соединений, являющихся производными пиразоло-пиридина: BAY 41-2272, BAY 41-8543, BAY 51-9491 была описана в работах [21-24], авторы которых исследовали механизм их активирующего влияния на растворимую гуанилатциклазу, а также изучали фармакологические свойства этих соединений.

Появлению подобных соединений предшествовало открытие нового NO - независимого производного бензил-индазола - YC-1 или 3-(5¹-оксиметил-2¹-фурил)-1-бензил индазол [25]. YC-1 оказался не только NO-независимым активатором растворимой гуанилатциклазы, но и усиливал активацию фермента NO-донорами. В присутствии YC -1 и донора NO наблюдалось (в зависимости от концентраций соединений) аддитивная или синергичная активация гуанилатциклазы [25]. Усиление активации растворимой гуанилатциклазы NO-донорами в присутствии YC-1 обусловлено связыванием последнего с аллостерическим участком белковой молекулы фермента [26, 27], расположенным в N-концевой части α_1 субъединицы [28]. В результате такого взаимодействия увеличивается сродство гема гуанилатциклазы к NO, снижается скорость

диссоциации нитрозил-гемового комплекса и повышается стимуляция фермента NO-донорами [26]. Способность YC -1 повышать чувствительность растворимой гуанилатциклазы к ее физиологическому активатору NO имеет большое фармакотерапевтическое и физиологическое значение. Использование соединений, аналогичных по своему действию YC -1, позволит существенно снижать дозы нитровазодилаторов и других NO-доноров (а, следовательно, уменьшать или устранять нежелательные побочные эффекты) без снижения эффективности их лечебного действия. Такое направление исследований представлялось нам заслуживающим внимание и нами было выявлено и изучено соединение, являющееся производным (1,2,3-триазолил)-1,2,5- оксадиазола, которое потенцировало NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы.

Важная роль повсеместно распространенной сигнальной системы. NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP в функции клеток, нарушение активности этой системы при многих патологических состояниях (гипертония, астма, сепсис, септический шок, злокачественные новообразования) требуют создания препаратов, которые бы направленно регулировали активность этой системы и таким образом устраняли бы возникшие нарушения. Подобные модуляторы активности гуанилатциклазы не только способствовали бы выяснению физиологической значимости этого фермента но и, что не менее существенно, могли бы использоваться в качестве терапевтических средств. Что касается гипертонии, при которой наблюдается дефицит в образовании эндогенного NO, то в настоящее время имеется целый арсенал новых доноров NO [29] и кроме того, как было отмечено выше, разрабатываются новые подходы к созданию соединений, способных усиливать действие NO-доноров за счет снижения концентраций последних, но без снижения эффективности их вазодилаторного действия. Такие же заболевания как астма, сепсис, септический шок, связанные с резким усилением образования NO и необходимостью торможения NO-зависимой активации гуанилатциклазы - то такие препараты практически отсутствуют. Известные ингибиторы растворимой гуанилатциклазы, такие как метиленовый синий, LY 83583 - неспецифичны [9]. Недавно предложенный ингибитор NO-зависимой активации - 1H-[1,2,4]-оксадиазоло-[4,3-d] хиноксалин-1 (ODQ) [30], на самом деле, оказался ингибитором гем-зависимой активации гуанилатциклазы [31].

В связи с этим мы попытались выяснить возможную роль сигнальной системы: NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP в действии лекарств, которые применяются при лечении заболеваний, связанных с избыточным генерированием NO - например при астме. Таким препаратом является амброксол (lasolvan) - производное алкалоида визицина, являющегося активным метаболитом бромгексина (bisolvan). Амброксол успешно используется в настоящее время при лечении астмы и других воспалительных процессов в дыхательных путях, характеризующихся избыточным образованием оксида азота. Интенсивное образование NO при этих патологических состояниях обусловлено экспрессией индуцибельной NO-синтазы [32], которая сопровождается резким повышением активности растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP [33]. 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) [34], используя для этого гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и легких крысы.

Было показано, что амброксол в диапазоне концентраций 0,1 - 10 мкМ не влияет на базальную активность обоих ферментов, но слегка активирует их при 50 и 100 мкМ. Амброксол снижает активацию этих ферментов нитропруссидом натрия примерно с одинаковой интенсивностью (величины IC₅₀ составляют 3,9 и 2,1 мкМ, соответственно). Амброксол тормозит также (на 73%) активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека Sin-1 - другим NO-донором, но не влияет на активацию фермента протопорфирином IX, активация которым (в отличие от NO) не связана с гемом [7] Эти данные указывают, что молекулярный механизм

терапевтического действия амброксола включает в себя ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы [34]. Какое значение могут иметь эти результаты для практической медицины? Впервые выявленная способность амброксола избирательно тормозить NO-зависимую активацию гуанилатциклазы, а также обнаруженная аналогия в интенсивности ингибирования амброксолом двух гуанилатциклаз (из тромбоцитов человека и легких крысы [34]) показывают, что исследование гуанилатциклазной активности в тромбоцитах больных астмой и ингибирование этой активности амброксолом может быть использовано для разработки нового биохимического теста для определения тяжести заболевания и эффективности лечения амброксолом используя тромбоциты. Поскольку воспалительные процессы в дыхательных путях у людей больных астмой сопровождаются экспрессией индуцибельной NO-синтазы было выдвинуто представление о возможном создании новых муколитических препаратов на основе ингибиторов NO-синтазы [33]. Полученные нами данные о торможении амброксолом NO-зависимой активации гуанилатциклазы впервые указывают на возможность создания новых муколитических средств на основе ингибиторов NO-зависимой активации гуанилатциклазы [34].

Следующим лекарственным препаратом в механизм терапевтического действия которого могла быть вовлечена сигнальная система: NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP - был антималярийный препарат - артемизинин. Малярия широко распространена во многих регионах мира. Отсутствие вакцин и опасность развития устойчивости к используемым антималярийным средствам настоятельно требуют поиска и создания новых антималярийных препаратов. Артемизинин, выделенный из экстрактов *Artemisia annua* и относящийся к группе эндопероксид-содержащих сесквитерпеноидов, применяется в медицине при лечении малярии [35, 36]. В отличие от многих других антималярийных препаратов артемизинин эффективен против форм этого заболевания, устойчивых к препаратам производных 4-аминохинолина [37]. Кроме того, в настоящее время неизвестен ни один малярийный токсин человека устойчивый к артемизинину [38]. 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. Мы обратили внимание на то, что хотя молекулярный механизм антималярийного действия артемизинина не выяснен, фармакологический эффект препарата связывают с взаимодействием соединения с гемом (феррипротопорфирином IX) или 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) [39]. Предполагают, что взаимодействие артемизинина с гемом тормозит образование гемозоина и определяет эффективность антималярийного действия артемизинина [40]. Следует заметить, что целый ряд соединений (в том числе метиленовый синий) способные связываться с гемом, обладают антималярийной активностью [41, 42]. Известно, что метиленовый синий ингибирует активность растворимой гуанилатциклазы и активацию фермента NO-донорами [43].

При исследовании влияния артемизинина 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) мы показали, что артемизинин не влияет на базальную активность, но тормозит активацию фермента NO-донорами. Зависимое от концентрации артемизинина 50% снижение активации гуанилатциклазы тромбоцитов человека нитропруссидом натрия (IC_{50}) наблюдается при концентрации 5,6 мкМ. Артемизинин (10 мкМ) тормозит также активацию фермента Sin-1 (на $87 \pm 7\%$) и 10 мкМ 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазоло-2-оксидом (на $71 \pm 4\%$). В то же время

артемизинин не влияет на активацию фермента протопорфирином IX активация которым (в отличие от NO) не связана с гемом [7], что предполагает участие гема в этом процессе. Выявленный эффект артемизинина не обусловлен взаимодействием NO с кислородными радикалами, образующимися из артемизинина во время его реакции с гемом гуанилатциклазы, поскольку на ингибирующую способность артемизинина не влияет присутствие в пробе супероксиддисмутазы [44]. Молекулярный механизм выявленной нами ингибиторной эффективности артемизинина 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 [44]. Появившееся недавно 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 [45], пока не получило дальнейшего независимого подтверждения. 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) [46] и величина IC_{50} для артемизинина, определенная нами (5,6 мкМ), как раз находится в интервале этих концентраций [44]. При фармакологической оценке обнаруженного нами эффекта артемизинина следует принимать во внимание тот факт, что в ряде случаев протекание вызванной *P. falciparum* малярии характеризуется патофизиологическими изменениями, выражающимися в сильной системной и легочной вазодилатации, что может приводить к летальным исходам [47, 48]. Данное патологическое состояние имеет много общего с септическим шоком, который сопровождается резким усилением NO-зависимой активации гуанилатциклазы [8]. Гипотензию при септическом шоке можно было купировать метиленовым синим, который повышал давление у каждого пациента [49, 50]. Не исключена возможность аналогичного действия артемизинина. Таким образом, полученные нами данные 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 противопаразитных препаратов на активность растворимой гуанилатциклазы.

Роль сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP при злокачественных новообразованиях исследована недостаточно и имеющиеся в литературе данные достаточно разноречивы. С одной стороны, NO может вызывать апоптоз в различных линиях клеток как по cGMP-зависимому, так и по cGMP-независимому механизмам [51, 52]. С другой стороны, NO может защищать клетки от гибели в результате избыточного образования NO [53]. Влияние NO на рост опухоли также противоречиво и зависит от целого ряда факторов: типа опухоли, стадии развития, уровня NO и используемой терапии [54]. Было показано, что в условиях *in vitro* образование NO повышает эффективность ряда химиотерапевтических препаратов [55], тогда как торможение биосинтеза NO рядом медикаментозных средств (например 5-фторурацилом) снижает пролиферацию некоторых опухолевых клеток [56].

Недавно было показано, что сигнальная система: NO -растворимая гуанилатциклаза - cGMP влияет на выживаемость пролиферирующих лейкомиических клеток L1210. 1-H[1,2,4]-оксадиазоло-[4,3-*d*]хиноксалин-1 (ODQ)-ингибитор растворимой гуанилатциклазы вызывает заметное усиление каспазной активности, которая ассоциируется с потерей жизнеспособности клеток и снижением содержания cGMP [57], а YC-1 (аллостерический активатор растворимой гуанилатциклазы) и 8-Br cGMP (проникающий в клетки аналог cGMP) предупреждают апоптоз [57]. Метиленовый синий (известный ингибитор

NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы) также тормозит рост лейкемических клеток L1210 и P388. Ранее было показано, что противоопухолевый антибиотик стрептонигрин (брунеомицин) тормозит рост лейкемических клеток L1210 [58, 59]. Биохимический механизм фармакологического действия стрептонигрина исследовался детально только с точки зрения его влияния на нуклеиновые кислоты. До сих пор считается, что стрептонигрин тормозит активность топоизомеразы II, вызывает деструкцию ДНК и РНК и блокирует их биосинтез [60]. Основным фармакофорным фрагментом молекулы стрептонигрина является замещенный хинолинхиноидный фрагмент, определяющий цитотоксичность стрептонигрина [59]. Такой же фрагмент присутствует и в молекуле LY 83583 - ингибитора NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы [9, 61]. Поэтому мы исследовали влияние стрептонигрина и ряда его производных на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента NO-донорами (нитропруссидом натрия и спермин NONO). Результаты исследований показали, что стрептонигрин (0,1-5 мкМ) не влияет на базальную активность растворимой гуанилатциклазы, но ингибирует зависимость от концентрации стрептонигрина активацию фермента нитропруссидом натрия с величиной IC_{50} 4,16 мкМ, а также активацию спермин NONO; в то же время стрептонигрин не изменяет стимуляцию фермента протопорфирином IX, активирующее влияние которого (в отличие от NO) не связано с гемом гуанилатциклазы [7, 61]. Способность стрептонигрина ингибировать активацию гуанилатциклазы NO-донорами, но не протопорфирином IX предполагает участие гема гуанилатциклазы в этом процессе. Однако, присутствие в супернатанте 105 000g озвученной суспензии тромбоцитов, который использовался в качестве фермента, других гем-содержащих белков исключало возможность спектрофотометрического определения взаимодействия стрептонигрина с гемом гуанилатциклазы. Поэтому мы исследовали взаимодействие стрептонигрина с гемом оксигемоглобина. Результаты показали, что никаких изменений в УФ абсорбционных спектрах оксигемоглобина не обнаружено [61]. Для окончательного выяснения вопроса об участии гема гуанилатциклазы в ингибирующем действии стрептонигрина необходимы дальнейшие исследования. Торможение стрептонигрином за счет возможного генерирования из его молекулы супероксид анион радикала исключалось, благодаря отсутствию изменений в тормозящем эффекте стрептонигрина в присутствии супероксид дисмутазы. Все использованные производные стрептонигрина, различающиеся заместителями в положении 2¹ центрального пиридинового фрагмента, но сохраняющие в молекуле фармакофорный фрагмент, отвечающий за цитотоксический эффект соединений [61], также ингибировали NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Следует отметить, что величины ингибирующих эффектов использованных соединений варьировали от 26 до 85 % в зависимости от их структуры. Однако, отсутствие корреляции между ингибированием NO-зависимой активации фермента и цитотоксическим эффектом соединений [61], по-видимому, исключает прямое участие растворимой гуанилатциклазы в молекулярном механизме противоопухолевого действия стрептонигрина [61]. Тем не менее, выявленный новый биохимический эффект препарата необходимо принимать во внимание при оценке эффективности его противоопухолевого действия и возможных побочных эффектов.

Представленные результаты о вовлечении сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP (прямо или косвенно) в механизм терапевтического действия некоторых лекарственных препаратов имеют важное значение как для создания новых эффективных лекарственных средств, так и для уточнения (а, возможно, и пересмотра) существующих представлений о механизмах лечебного действия ряда старых лекарств. Так, нами впервые было показано, что сигнальная система: NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP может быть вовлечена в механизм терапевтического действия таких широко

используемых препаратов как химиотерапевтическое средство - метронидазол (1-(2-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол, см. рис.1) и антипротозойный препарат - нитазол (2-ацетиламино-5-нитротиазол, см. рис.1). С использованием электрохимических методов и методов ЭПР было показано, что метронидазол легко дает продукт одноэлектронного восстановления нитрогруппы (анион-радикал), способный разрушать ДНК, РНК и другие важные макромолекулы и именно этот анион-радикал, по-видимому, ответственен за биологическую активность препарата. Однако, вопрос о механизме терапевтического действия метронидазола не может считаться окончательно решенным. Существует мнение, что действующей активной формой препарата является его гидроксиламино-производное, образующееся при его восстановлении. В этом плане следует обратить внимание на возможность отщепления нитрогруппы в виде нитрат-аниона при его щелочном гидролизе. На основе этого было выдвинуто предположение о возможной биотрансформации метронидазола с высвобождением оксида азота. Действительно, в результате гидролитического расщепления метронидазола наблюдалось генерирование оксида азота. Наши опыты впервые показали, что метронидазол активировал растворимую гуанилатциклазу и приводит к накоплению cGMP [62]. Одновременно, было показано, что метронидазол понижает артериальное давление у норм и гипертензивных крыс с выраженностью гипотензивного эффекта, характерной для нитросорбитмононитрата [62]. Аналогичные результаты были получены и с другим лекарственным средством - антипротозойным препаратом - нитазолом (1-(2-этилсульфонэтил)-2-метил-5-нитроимидазол, см. рис.1). В результате гидролитического расщепления нитазол генерировал NO и активировал растворимую гуанилатциклазу [63]. Новые доноры оксида азота были выявлены также и в ряду производных пятичленных гетероциклов, среди которых оказался химиотерапевтический препарат - тинидазол (1-(2-этилсульфонэтил)-2-метил-5-нитроимидазол, см. рис.1). Соединение генерировало оксид азота и активировало растворимую гуанилатциклазу [64]. Полученные результаты пока не позволяют пересмотреть принятые в настоящее время механизмы терапевтического действия этих лекарственных препаратов. Однако, несомненно, что представленные 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.

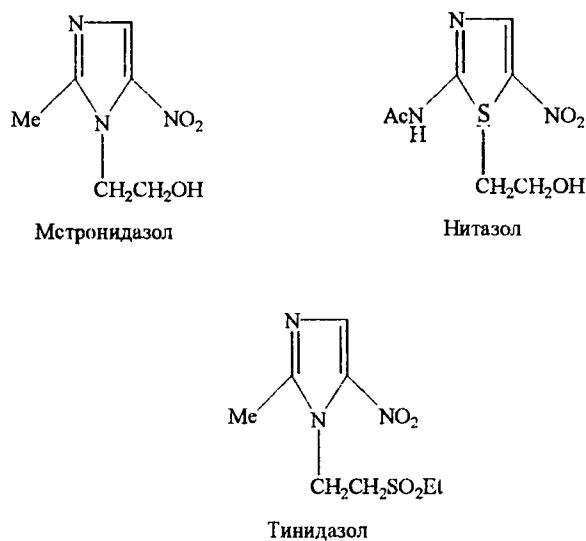


Рисунок 1

Химические структуры метронидазола (1-(2-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол), нитазола (2-ацетиламино-5-нитротиазол) и тинидазола (1-(2-этилсульфонэтил)-2-метил-5-нитроимидазол).

Итак, растворимая гуанилатциклаза играет центральную роль в передаче внутриклеточных и внеклеточных сигналов передаваемых NO и физиологическое значение этого фермента огромно. Создание селективных модуляторов активности этой системы позволит не только выяснить биологическую роль и физиологическую значимость гуанилатциклазы, но и будет способствовать появлению новых эффективных лекарственных препаратов

Результаты собственных исследований получены при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№: 02-04-48319, 03-04-06875, 03-04-48224).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palme, R.M.J., Ferrige A.G., and Moncada S.* (1987) *Nature*, **327**, 5524-5526.
2. *Murad F.* (1994) *Adv. Pharmacol.*, **26**, 19-36.
3. *Ignarro L.I., and Wood K.S.* (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **928**, 160-170.
4. *Gerzer R., Garbers D.L.* (1982) *Fed. Proc.*, **41**, 1410.
5. *Graven P., De Ruberties F.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 310-321.
6. *Ohlstein E.H., Wood K.S., Ignarro L.I.* (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 187-198.
7. *Ignarro L.I., Wood, K.S., Wolin M.S.* (1984) *Adv. Cycl. Nucl. Protein Phosphoryl. Res.*, **17**, 267-274.
8. *Hobbs A.J., Ignarro L.I.* (1996) *Methods Enzymol.*, **269**, 134-148.
9. *Hobbs A.J.* (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 484-491.
10. *Knowles R.J., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5159-5162.
11. *Hibbs G.B., Tailor, R.E., Varvin Z.* (1987) *Science*, **235**, 473-476.
12. *Busse R., Luchoff A., Bassenge E.* (1987) *Naunyn-Schmiedebergers Arch. Pharmacol.*, **336**, 566-571.
13. *Brunton T.L.* (1867) *Lancet*, 1857II, 561-564.
14. *Ignarro L.J.* (1990) *Pharmacol. Toxicol.*, **67**, 1-7.
15. *Severina I.S., Belushkina N.N., Grigoryev N.B.* (1994) *Biochem. Mol. Int.*, **33**, 957-967.
16. *Северина И.С.* (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 3-35.
17. *Коц А.Я., Хронов Ю.В., Графов М.А., Куликов А.С., Овчинников И.В., Белушкина Н.Н., Бусыгина О.Г., Гаврилова С.А., Махова Н.Н., Медведева Н.А., Булгарина Т.В., Северина И.С.* (2001) Патент РФ на изобретение № 216526 от 20. 04.
18. *Needelman P., Johnson Jr.E.M.* (1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **184**, 709-715.
19. *Buchmuller-Rouiller Y., Mauel J.* (1991) *J. Immunol.*, **146**, 217-223.
20. *Hussain M.B., Hobbs A.J., Macallister R.J.* (1999) *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1082-1088.
21. *Straub A., Stasch J.P., Alonso-Alija C., Benet-Buchholts J., Duche B., Feurer A., Furstner C.* (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 781-784.
22. *Stasch J.P., Becker E.M., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowski K., Feurer A., Gerzer R., Minuth T., Perzborn E., Pleiss U., Schroder H., Stahl E., Steinke W., Straub A., Schramm M.* (2001) *Nature*, **410**, 212-215.
23. *Stasch J.P., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowski K., Feurer A., Minuth T., Perzborn E., Schramm M., Straub A.* (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 333-343.
24. *Stasch J.P., Dembowski K., Perzborn E., Stahl E., Schramm M.* (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 344-355.
25. *Mulsch A., Bauersachs J., Schafer A., Stasch J.P., Kast R., Busse R.* (1997) *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 681-689.
26. *Fiebe A., Koesling D.* (1998) *Mol. Pharmacol.*, **53**, 123-127.
27. *Fiebe A., Russwurm M., Mergia E., Koesling D.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 15253-15257.

28. *Russwurm M., Mergia E., Mullerschauen F., Koesling D.* (2002) *J. Biol Chem.*, **28**, 24883-24888.
29. *Граник В.Г., Григорьев Н.Б.* (2002) *Известия Академии Наук. Серия химическая*, № 8, 1268 -1313.
30. *Carthwaite J., Southam E., Boulton G.L., Nielsen E.B., Schmidt R., Mayer B.* (1995) *Mol. Pharmacol.*, **48**, 184-188.
31. *Schreammel A., Behreds S., Schmidt K., Koesling D., Mayer B.* (1996) *Mol. Pharmacol.*, **50**, 1-5.
32. *Kharitonov S.A., Yates D.H., Robbins R.A., Logan-Sinclair R., Sinebourne E., Barnes P.J.* (1994) *Lancet*, **343**, 133-135.
33. *Barnes P.J.* (1995) *Ann.Med.*, **27**, 389-393.
34. *Severina I.S., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Khropov Yu.V., Krasnoperov R.A.* (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **407**, 61-64.
35. *Klayman D.L.* (1985) *Science*, **228**, 1049-1055.
36. *Ambroise-Thomas P.* (1999) *Bull. Acad. Natl. Med.*, **183**, 797-810
37. *Bennoit-Vical F., Robert A., Meunier B.* (1999) *Antimicro Agent Chemother.*, **43**, 2555-2558.
38. *Mechnick S.R.* (1998) *Med. Trop.*, **58**, 13-17.
39. *Goldberg D., Slater A.F., Cerami A., Henderson G.B.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 2931-2935
40. *Robert K.A., Meunier B.* (1997) *J. Am. Chem.*, **119**, 5968-5969.
41. *Ignatushchenko M.V., Winter R.W., Bachinger H.P., Hinrichs D.J., Riscoll M.K.* (1997) *FEBS Lett.*, **409**, 67-73.
42. *Atamna H., Krugliak M., Shalmiev H.G., Debaro E., Pescazmona G., Ginsburg H.* (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 693-700.
43. *Gruetter C.A., Kadowitz P.J., Ignarro L.I.* (1981) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 150-156.
44. *Severina I.S., Pyatakova N.V., Bussygina O.G., Mikhailitsin F.S., Khropov Yu.V.* (2002) *Eur.J.Pharmacol.*, **438**, 69-73.
45. *Ghigo D., Todde R., Ginsburg H., Costamang C., Gautret R., Bussolino F., Ulliers D., Giribaldi G., Dharo E., Gabrielli G., et al* (1995) *J. Exp. Med.*, **182**, 677-688
46. *Schildbach S., Wernsdorfer W.H., Suehsaeng L., Rooney W.* (1990) *South. Asian J. Med. Public Health*, **21**, 29-38.
47. *Charoenpan P., Indrapasit S., Kiathoonsri S., Suvachitant O., Tanomau S.* (1990) *Chest*, **97**, 1190-1197.
48. *Bruneel F., Gachot B., Timsit J.E., Wolf M., Bedos J., Pegnier B., Vacon F.* (1997) *Intensive Care Med.*, **23**, 698-701.
49. *Driscoll W., Thurin S., Carrien V., Stenborn R.H., Morun F. C.* (1995) *J. Pediatr.*, **129**, 904-908.
50. *Drown G., Frankl D., Phang T.* (1996) *Postgrad. Med. J.*, **72**, 612-614.
51. *Shimojo T., Hiroe M., Ishiyama S., Ike H., Nishikawa T., Marumo F.* (1999) *Exp. Cell Res.*, **247**, 36-47.
52. *Ward C., Wong T.H., Murray J., Rahman I., Haslett C., Chilvers E.R., Rossi A.G.* (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 305-314.
53. *Tippeswamy T., Morris R.* (1997) *Brain Res.*, **774**, 116-122.
54. *Wink D.A., Vodovotz Y., Cook J.A., Krishna M.C., Kim S., Coffin D., DeGraff W., Deluca A.M., Liebman J., Mitchell J.B.* (1998) *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 802-809.
55. *Cook J.A., Krishna M.C., Pacelli R., Kim S., DeGraff W., Gamson J., Vodovotz Y., Russa, A., Mitchell J.B.* (1997) *Nitric Oxide*, **1**, 88-94.
56. *Jim Y., Heck D.E., DeGeorge G., Tian Y., Laskin J.D.* (1996) *Cancer Res.*, **56**, 1978-1982.
57. *Flamigni F., Facchini A., Stanie. I., Tantini B., Bonavita F., Stefanelli C.* (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 319-328.

58. *Shorin V.A., Bazhanov V.S.* (1974) Антибиотики, **19**, 679-684.
59. *Boger D.L., Yasuda M., Mitcher L.A., Drake S.D., Kito S.P., Thompson S.C.* (1987) J. Med. Chem., **30**, 1918-1928.
60. *Bolzan A.D., Bianchi M.S.* (2001) Mutat. Res., **488**, 25-37.
61. *Severina I.S., Pyatakova N.V., Preobrazhenskaya M.N., Khropov Yu.V.* (2004) Eur. J. Pharmacol., **483**, 127-132.
62. *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) Вopr. биол. мед. фармацевт. химии, **4**, 10-14.
63. *Левина В.И., Азизов О.В., Пятакова Н.В., Северина И.С., Арзамасцев А.П., Григорьев Н.Б.* (2002) Вopr. биол. мед. фармацевт. химии, **4**, 6-10.
64. *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.

Поступила 07.02.2004.

NO: A NEW LOOK ON THE MECHANISM OF ACTION OF OLD DRUGS

I.S. Severina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10,
Moscow, 119121 Russia, fax: (095)245-0857

The paper reviews the main approaches used for development of effective therapeutic means directly regulating signaling system "nitric oxide (NO) - soluble guanylate cyclase - cyclic guanosine monophosphate (cGMP)". Special attention is paid to the role of this system in the mechanism of action of so called "old drugs". Using new approaches for investigating the antihypertensive and antiaggregatory action of NO and the role of guanylate cyclase in these processes the priority and fundamental data concerning the elaboration of the molecular basis of directed search and creation of new, effective antihypertensive and antiaggregatory compounds have been obtained. Studies of direct activation of soluble guanylate cyclase by the original NO-donors new activators of this enzyme resulted in discovery of new drugs participating in regulation of haemostasis and vascular tone. The priority data on new inhibitors of NO-dependent activation of guanylate cyclase (among which turn to the drugs) and the possible molecular mechanism of their pharmacological action are presented. It was shown at first time that the signaling system "NO-soluble guanylate cyclase-cGMP" may be involved in the mechanism of the therapeutic action of a number of widely used drugs including those acting as chemotherapeutics and antiprotozoics.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxide, activators, inhibitors.