

УДК 577.152.6

©Северина

ОКСИД АЗОТА. ПОТЕНЦИРОВАНИЕ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ – (ПАТО)ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ И ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

И.С. Северина

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Погодинская ул., 10, Москва 119121; факс: (095)245-0857; эл. почта: irina.severina@ibmc.msk.ru

Рассмотрены вопросы, касающиеся молекулярного механизма физиологических эффектов оксида азота (NO), роли внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) в реализации действия NO. Приводятся данные об основных химических характеристиках гуанилатциклазы, таких как, субъединичная структура, изоформы, современные представления о каталитическом и регуляторном центрах фермента. Показана роль гема (протетической группы) гуанилатциклазы и самого фермента в реализации физиологических эффектов NO. Приводятся данные о новом NO-независимом, аллостерическом активаторе гуанилатциклазы YC-1 (производным бензил индазола), способным синергично усиливать NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Представлены данные об участках гуанилатциклазы, ответственных за связывание фермента с YC-1 и возможном молекулярном механизме синергичного усиления NO-зависимой активации гуанилатциклазы в присутствии YC-1. Впервые выявлены и исследованы эндогенные соединения, потенцирующие и синергично усиливающие активацию растворимой гуанилатциклазы NO-донорами. Обсуждается важное физиологическое, фармакотерапевтическое и (пато)физиологическое значение этого факта.

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

ВВЕДЕНИЕ. Оксид азота (NO) является ключевой сигнальной молекулой, участвующей в регуляции различных биологических и физиологических процессов в живых организмах. Огромное количество экспериментальных и клинических данных указывает на то, что сниженная и/или ослабленная реакция на эндогенно образовавшийся оксид азота приводит к нарушению функций сердечно-сосудистой, центральной нервной и легочной систем, к возникновению заболеваний различных органов и тканей в том числе печени, почек, эндотелия.

Эндогенный NO образуется из L-аргинина за счет окисления азота аминокислотной группы гуанидинового фрагмента под действием L-аргинин-NO-синтазы [1]. Основным внутриклеточным рецептором оксида азота является растворимая гуанилатциклаза. Фермент катализирует биосинтез циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP) из гуанозинтрифосфата (GTP). сGMP – вторичный посредник, мощный регулятор метаболизма клетки, в значительной степени определяющей ее функции [2, 3]. Гидролиз сGMP осуществляется фосфодиэстеразой [4]. Однако, основным ферментом обмена сGMP считается гуанилатциклаза и за накопление сGMP в клетках ответственен именно этот фермент.

Растворимая гуанилатциклаза является широко распространенным ферментом, она обнаружена в цитозольной фракции практически всех клеток млекопитающих [5-8]. Тем не менее исследования физиологической значимости гуанилатциклазы развивались значительно медленнее по сравнению с аденилатциклазой [9]. Интерес к гуанилатциклазе резко возрос только в конце прошлого века после установления химической природы эндотелиального фактора релаксации (ЭДФР) как NO [10-12]. И все же, публикации, посвященные ферменту гуанилатциклазе, отстают от публикаций, касающихся непосредственно оксида азота. Это обусловлено низкими концентрациями растворимой гуанилатциклазы внутри клеток, а также трудностями, связанными с очисткой фермента. Однако, главным тормозом в выяснении биологической значимости гуанилатциклазы оказалось то, что наиболее сильный регулятор фермента был идентифицирован только в конце 80 г. В 70-е г. было установлено, что свободный радикал NO является сильным активатором растворимой 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-сGMP [9].

Гуанилатциклаза существует в двух формах: мембраносвязанная и растворимая. Эти формы не только разные белки, но и ферменты с различными механизмами регуляции [14]. Мембраносвязанная гуанилатциклаза – это мономер, представляющий собой единую полипептидную цепь [15-17]. Эта форма фермента служит рецептором для натрий уретических пептидов [18]. Растворимая гуанилатциклаза – это гетеродимер, состоящий из двух иммунологически различных субъединиц: большей (α) и меньшей, связывающей гем, β -субъединицы. Простетической группой фермента считается гем. Именно гем отвечает за чувствительность фермента к NO [19, 20]. Гем-дефицитная гуанилатциклаза не может активироваться оксидом азота [21] до тех пор, пока гем не будет введен в молекулу фермента; гем-реконструированная гуанилатциклаза активируется NO [22, 23].

Вопрос о том какую роль играют α - и β - субъединицы в связывании гема был предметом оживленной дискуссии. Одно время считалось, что в связывании гема с гуанилатциклазой принимают участие обе субъединицы и что гем располагается в виде сэндвича между ними, а для связывания необходимы полноразмерные цепи N-концевых последовательностей α - и β - субъединиц [24, 25]. Однако, дальнейшие исследования показали, что удаление 259 аминокислотных остатков из N-концевой части α_1 -субъединицы и последующая коэкспрессия последней с β_1 -субъединицей приводит к образованию мутантного фермента, который не теряет чувствительности к NO и YC-1 и сохраняет способность связывать гем. Удаление же 364 аминокислотных остатков из N-концевой части α_1 -субъединицы приводит к формированию фермента, который нечувствителен к гем-зависимым активаторам NO и YC-1, но сохраняет способность связываться с гемом, демонстрируя при этом типичный сдвиг в спектре, характерный для связывания NO с простетической гемовой группой [26]. Эти данные показывают, что

N-аминоконцевая часть α_1 -субъединицы не участвует в связывании гема, однако, аминокислотная последовательность между 259 и 364 остатками представляет собой важный функциональный домен для передачи активированного NO сигнала и по-видимому, является мишенью для чувствительного к NO соединения - YC-1. Таким образом, участок, ответственный за связывание гема с гуанилатциклазой, расположен в N-концевой части β_1 -субъединицы [26].

Существуют четыре субъединицы растворимой гуанилатциклазы человека: α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Из них образуются гетеродимеры, наиболее изученными являются $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_1$ [27, 28]. 619 аминокислотный остаток β -субъединицы содержит эволюционно-консервативный NH_2 -концевой гем-связывающий домен, длина которого составляет около 200 остатков [29-31].

Протетическая гемовая часть фермента, наиболее чувствительная к NO, расположена в гем-связывающем домене β -субъединицы. Гем связывается с белком путем образования нековалентной связи железа гема с осевым лигандом - имидазолом His-105. Пропионовые остатки гема связываются с другими якорными остатками: Tyr-135, Ser-137 и Arg-139 [31-33]. Точечная мутация His-105 β -субъединицы на Phe разрушает связь гема с белком и рекомбинантная гуанилатциклаза теряет способность к активации NO, сохраняя базальную каталитическую активность. Мутация 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 [34]. Каталитический и регуляторный центры фермента разобщены и находятся в разных областях субъединиц [9]. Каталитический участок гуанилатциклазы расположен в C-концевых частях α - и β - субъединиц [9]. Каталитический домен проявляет высокую степень гомологии как между мономерами растворимой гуанилатциклазы, так и в отношении C-концевой части мембраносвязанной гуанилатциклазы [35-38].

Для каталитической активности растворимой гуанилатциклазы необходима коэкспрессия C-концов α - и β -субъединиц. Мономер растворимой гуанилатциклазы неактивен [39]. Точная последовательность аминокислотных остатков, ответственных за димеризацию субъединиц, не выяснена, но она может быть похожей на последовательность, идентифицированную для мембраносвязанной гуанилатциклазы [40].

Эндогенный NO участвует во многих жизненно важных процессах. Он является нейротрансмиттером [41-43], цитотоксическим агентом [44], мощным фактором гемостаза. Оксид азота ингибирует агрегацию тромбоцитов [45], он идентичен ЭДФР [10] и рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилатор. Антигипертензивные и антиагрегантные свойства NO связаны с активацией растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP.

1. Механизм активации гуанилатциклазы оксидом азота.

В обычных условиях железо (Fe^{2+}) гема растворимой гуанилатциклазы связано координационно с четырьмя атомами азота центрального кольца гема и кроме того образует связь с осевым лигандом – His-105 β -субъединицы; т.е. образуется пяти-координационный гистидин-гемовый комплекс [21, 46]. Взаимодействие NO с этим комплексом приводит к образованию неустойчивого шести-координационного гистидин-гем-NO промежуточного продукта [16]. При этом атом железа гема выступает из плоскости порфиринового кольца, что приводит к расщеплению связи между His-105 и железом гема [47]. Образуется пяти-координационный нитрозил-гемовый комплекс, истинный активатор растворимой гуанилатциклазы [17, 48, 49]. Структура образовавшегося комплекса приближается к структуре протопорфирина IX, предшественника гема в организме и одного из сильных активаторов фермента [21, 46-49].

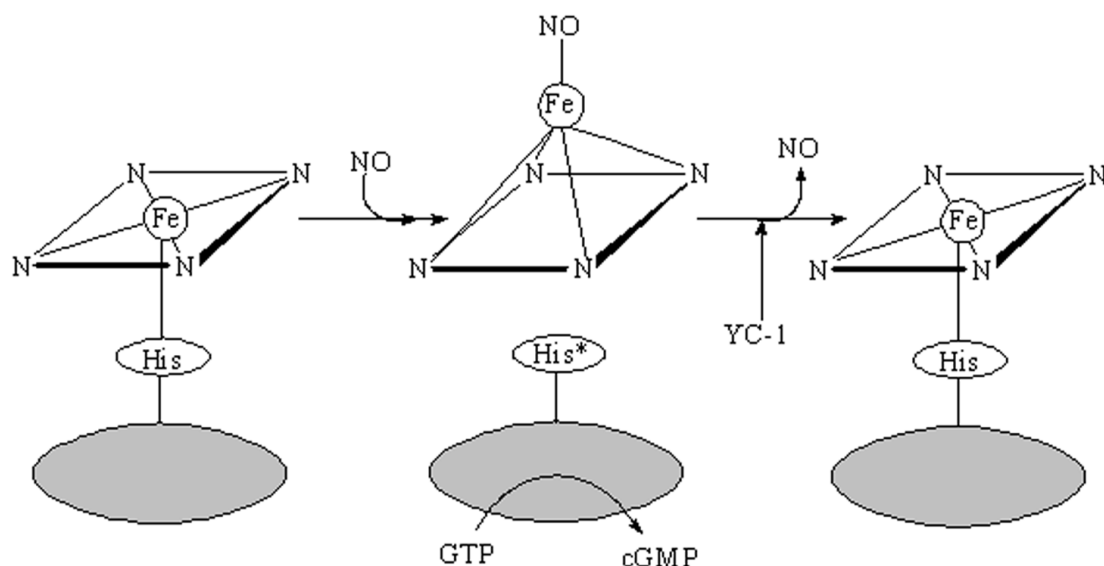


Рисунок 1.

Схематическое изображение активации растворимой гуанилатциклазы оксидом азота (NO).

В “спокойном” (неактивированном) состоянии гем гуанилатциклазы связан координационно с четырьмя атомами азота центрального кольца гема, а также образует пятую координационную связь с His-105 β-субъединицы. Взаимодействие с NO приводит к образованию неустойчивого шести координационного гистидин-гем-NO промежуточного продукта. При этом атом железа гема выступает из плоскости порфиринового кольца и разрывается связь между His-105 и железом гема. Образуется пятикоординатный нитрозил-гемовый комплекс - истинный активатор растворимой гуанилатциклазы. YC-1 замедляет диссоциацию NO от гуанилатциклазы и повышает чувствительность фермента к активации оксидом азота.

Следует отметить, что нитрозил-гемовые комплексы могут образовываться и в результате взаимодействия NO (или NO-доноров) с гемом других гем-содержащих белков (гемоглобин, миоглобин, каталаза). Однако, гуанилатциклаза характеризуется высоким сродством к нитрозил-гемовому комплексу что определяет возможность переноса его на фермент с других гем-содержащих белков, но не наоборот [50]. Ультрафиолетовый спектр очищенной гуанилатциклазы показывает пик поглощения при 431 нм (полоса Core) и полосу поглощения при 555 нм, что характерно для пяти-координатного Fe^{2+} гема, связанного с имидазольным кольцом [51]

2. Механизм антигипертензивного действия оксида азота.

Антигипертензивное действие оксида азота связано с активацией гуанилатциклазы в результате взаимодействия NO с гемом гуанилатциклазы и накоплением cGMP [52]. Последний активирует cGMP-зависимую протеинкиназу а также Ca^{2+} -АТФазу, участвующих в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выходу Ca^{2+} из мышечных волокон и в конечном итоге к вазодилатации [16, 53, 54]. Органические нитраты (нитроглицерин и др.) используются при лечении таких заболеваний как стенокардия, сердечная недостаточность уже более века [55]. Однако, механизм действия этих соединений был установлен только в конце 1970-х годов, когда было обнаружено, что в результате их метаболизма образуется NO, который взаимодействует с гемом гуанилатциклазы (по указанному выше механизму), активирует гуанилатциклазу и приводит к накоплению cGMP. 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 вазодилататорами. Несмотря на накопленное достаточно большое число активаторов гуанилатциклазы, относящихся к донорам оксида азота [17, 56, 57], 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 нитровазодилататорам, 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 [58], с избыточным уровнем супероксида, эндотелина или ангиотензина II [59, 60] и со снижением чувствительности активности рецептора NO - растворимой гуанилатциклазы [61]. Во-вторых, использование NO-доноров *in vivo* связано с неспецифическим взаимодействием NO с другими биологическими молекулами; такие реакции трудно контролировать из-за спонтанного освобождения NO из нитровазодилататоров и его свободной диффузии в биологических системах. В связи с этим создание соединений, способных активировать гуанилатциклазу по NO-независимому механизму, не обладающих толерантностью, представляет значительный интерес и может 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 [62-65], авторы которых исследовали механизм их активирующего влияния на растворимую гуанилатциклазу, а также изучали фармакологические свойства этих соединений.

3. Механизм потенцирования NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы YC-1.

Появлению подобных соединений предшествовало открытие нового NO-независимого активатора гуанилатциклазы – производного бензилиндазола – YC-1, или 3-(5'-оксиметил-2'-фурил)-1-бензилиндазол. YC-1 обладает гипотензивным и антиагрегантными свойствами [66-68]. Соединение не генерирует NO и активирует гуанилатциклазу независимо от NO [69, 70].

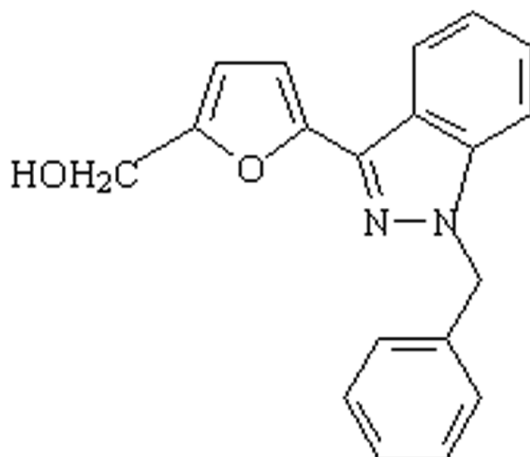


Рисунок 2.
Химическая структура YC-1.

Однако, по аналогии с NO, активирующий эффект YC-1 в значительной степени зависит от присутствия восстановленной простетической гемовой части растворимой гуанилатциклазы. Удаление или окисление гема фактически устраняет какую-либо активацию гуанилатциклазы YC-1 [71-74]. YC-1 активирует гуанилатциклазу независимо от NO [74, 75]. При этом YC-1 не только активирует растворимую гуанилатциклазу, но, и что особенно важно, потенцирует и синергично усиливает активацию фермента оксидом азота. Синергичное усиление NO-зависимой активации гуанилатциклазы в присутствии YC-1 связывают со снижением скорости диссоциации NO от гема [76, 77], увеличением сродства NO к гему и увеличением V_{\max} [78]. Помимо увеличения V_{\max} YC-1 снижает EC_{50} для NO (эффективная концентрация, вызывающая 50% активацию) примерно на 1 порядок. При этом происходит сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации NO [69]. На стабилизацию нитрозил-гемового комплекса в присутствии YC-1 и повышение NO-зависимой активации гуанилатциклазы указывалось и в более поздних работах [79]. Интересно, что YC-1 потенцирует и активацию гуанилатциклазы протопорфирином IX (предшественником гема) однако, при этом не происходит сдвига EC_{50} влево. Полагают, что в основе механизма этого явления лежит стабилизация активной конформации фермента [77, 79]. Кроме того, YC-1 способствует расщеплению связи гемового железа с остатком His-105 и превращению малоактивного шести-координационного нитрозил-гемового комплекса в высоко активный пяти-координационный (см. рис. 1, а также [80, 81]). Помимо оксида азота YC-1 потенцирует и действие слабого активатора растворимой гуанилатциклазы – CO до уровня, сопоставимого с активацией фермента под действием NO [51, 69, 82], и ингибирует фосфодиэстеразу, гидролизующую cGMP [83]. Как взаимодействует YC-1 с гуанилатциклазой окончательно не выяснено. Определенный успех в идентификации участков, ответственных за аллостерическую регуляцию YC-1, принесли сравнительные исследования двух ферментов: гуанилатциклазы и аденилатциклазы. Оба фермента катализируют циклизацию химически родственных субстратов GTP и ATP и имеют много общих функциональных и структурных черт [84, 85]. Прорыв в понимании структуры и функций семейства циклаз произошел когда была определена кристаллическая структура активной формы аденилатциклазы [86]. Было показано, что в белковой молекуле этого фермента находится один субстрат-связывающий участок, с которым взаимодействует ATP и другой участок, псевдосимметричный этому и являющийся регуляторным центром, с которым взаимодействует форсколин - аллостерический активатор аденилатциклазы. Моделирование по этому принципу растворимой гуанилатциклазы выявило аналогичную структурную организацию [85]. Ассоциация C-концевых остатков α - и β - субъединиц гуанилатциклазы приводит к образованию GTP-связывающего кармана, а второй карман, псевдосимметричный GTP-связывающему участку, обладает аллостерическими функциями; он аналогичен форсколин-связывающему центру аденилатциклазы и является YC-1 связывающим участком [87]. Используя аналогию с аденилатциклазой и псевдосимметричной структурой растворимой гуанилатциклазы, был проведен всеобъемлющий точно-направленный мутагенез. Скрининг этих мутаций привел к предположению, что должен существовать механизм синергичной активации, при котором одновременное связывание NO и YC-1 стимулирует каталитическую активность, благодаря конформационному изменению независимо от конформационных изменений, вызванных каждым из активаторов по отдельности. Было показано [88], что в результате точечной мутации можно разделить эффекты YC-1 на сродство и эффективность действия. Так например, замена остатка Cys-594 в α_1 -субъединице печени крысы на Ser приводит к мутанту, который проявляет высокую базальную активность и более высокое сродство к NO в присутствии YC-1, но при этом YC-1 не обладает синергичным действием [87]. Эти данные подтверждают, что во-первых, α_1 остаток Cys-594 является критичным

для механизма активации YC-1 и во-вторых, что замена на Ser приводит к другому типу взаимодействия YC-1 с ферментом, в результате которого предотвращается синергизм, но повышается индивидуальная активация. На основании литературных данных и результатов собственных исследований авторы статьи [88] предлагают структурную модель взаимодействия YC-1 с каталитическим участком растворимой гуанилатциклазы. Согласно этой модели, существуют два предпочтительных типа ориентации YC-1 в псевдосимметричном кармане растворимой гуанилатциклазы. Кристаллическая структура YC-1 показывает, что атом кислорода оксиметильной группы YC-1 (см. формулу YC-1) может участвовать в образовании водородной связи с определенными аминокислотными остатками молекулы фермента [89]. Таким образом, было предположено [88], что при одной ориентации этот кислород оксиметильной группы образует водородную связь с серином или цистеином в псевдосимметричном кармане гуанилатциклазы, а при другой ориентации - взаимодействует с одним ионом Mg^{2+} в субстрат-связывающем кармане фермента. Известно, что в каталитическом участке растворимой гуанилатциклазы находятся два иона Mg^{2+} [90]. Различные типы ориентации YC-1 в псевдосимметричном участке гуанилатциклазы могут быть обусловлены способностью YC-1 взаимодействовать или не взаимодействовать с ионом Mg^{2+} , который принимает участие в катализе. Предложенная выше гипотеза получила подтверждение в недавних исследованиях, которые показали что YC-1 и родственные ему соединения, взаимодействуют с каталитической субъединицей растворимой гуанилатциклазы [91]. Несмотря на отсутствие в настоящее время единого представления о механизме активации NO в присутствии YC-1, сам факт открытия YC-1 и соединений, аналогичных ему по своему действию, имеет огромное значение для решения задач практической медицины [92]. Выявление NO-независимых активаторов растворимой гуанилатциклазы является одним из главных нововведений последнего времени, которое будет способствовать созданию новых эффективных лекарственных средств. Направленное воздействие на сигнальную систему NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP открывает новые возможности для лечения различных форм сердечно-сосудистых, легочных, эндотелиальных и почечных дисфункций. В свете изложенного особое значение приобретает выявление соединений эндогенной природы, аналогичных по своему действию YC-1 и способных синергично усиливать активацию гуанилатциклазы NO-донорами.

Представления о важных функциях внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP в регуляции различных биологических и физиологических процессов в живых организмах все время расширяются. Недавно было показано, что YC-1 и 8-Br сGMP (проникающий в клетки аналог сGMP) защищают клетки от апоптотических стимулов, а следовательно, и их гибели [93]. С другой стороны, ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (1-H[1,2,4]-оксодиазоло [4,3- α] хиноксалин-1) вызывает значительное усиление каспазной активности, ассоциирующейся с потерей жизнеспособности клеток и снижением в них уровня сGMP [93]. Метиленовый синий (хорошо известный ингибитор NO-зависимой активации гуанилатциклазы) ингибирует рост лейкемических клеток линии L1210 и P388 [94]. Более того, было показано, что уровень сGMP в плазме нелеченых больных раком значительно выше чем у здоровых людей и он нормализуется при ремиссии [95]. Другими словами, увеличение уровня сGMP может способствовать развитию пролиферативных процессов в клетке. Действительно, в литературе имеется достаточное количество данных, указывающих на определенную роль сGMP в пролиферативных процессах в клетке [93, 96-98]. Известно, что важную роль в процессах роста и деления клеток приписывают и полиаминам, которые как было показано ранее [99], активировали растворимую гуанилатциклазу в клеточных культурах сердца и повышали уровень сGMP. Поскольку специфические биологические функции полиаминов в процессах роста и деления клеток не установлены, а влияние

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ NO

полиаминов на сигнальную систему NO-растворимая гуанилатциклаза-sGMP изучено крайне мало мы исследовали влияние полиаминов (путресцина, спермидина, спермина) на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и на стимуляцию фермента NO-донором (нитропруссидом натрия) и YC-1. Наши исследования показали [100], что все изученные полиамины не только активировали гуанилатциклазу тромбоцитов человека, но и потенцировали (аналогично YC-1, но менее эффективно) стимуляцию фермента NO-донором. Стимулирующие эффекты нитропрussa натрия и путресцина (или спермина) были аддитивны, а спермидин синергично усиливал аддитивный эффект до 136%; т.е. полиамины и нитропруссид натрия действовали на два разных участка фермента. Все использованные полиамины тормозили активацию гуанилатциклазы YC-1 и снижали синергично увеличенную стимуляцию фермента нитропруссидом натрия [100]. Механизм активации полиаминами гуанилатциклазы пока остается невыясненным. Ранее было отмечено, что полиамины повышают сродство растворимой гуанилатциклазы к субстрату, также как и V_{max} [99]. Более того, полиамины, по-видимому, могут замещать катион металла, являющегося кофактором фермента; т.е. взаимодействовать с каталитическим участком активного центра гуанилатциклазы. Интересно, что наибольшим сродством к катионному участку обладает спермидин [99]. Среди использованных полиаминов именно спермидин (аналогично YC-1, хотя и менее эффективно) синергично усиливал NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Каков механизм торможения полиаминами активации растворимой гуанилатциклазы YC-1 и ингибирования ими синергичного усиления стимуляции фермента нитропруссидом натрия в присутствии YC-1 пока неизвестно. Необходимы дальнейшие исследования. Однако, учитывая эндогенную природу полиаминов, выявленное нами свойство этих соединений потенцировать и синергично усиливать (аналогично YC-1 хотя и менее эффективно) NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы не только указывает на новый биохимический эффект этих соединений, но и на необходимость принимать этот факт во внимание, особенно учитывая эндогенную природу полиаминов и важную роль sGMP в пролиферативных процессах в клетке [93-99]. Не исключено, что специфические биологические функции полиаминов в процессах роста и деления клеток могут быть связаны также и со способностью этих соединений усиливать активацию гуанилатциклазы и повышать уровень sGMP.

Другими соединениями, также эндогенной природы, которые синергично усиливали активацию растворимой гуанилатциклазы NO-донорами (т.е. проявляли свойства аналогичные YC-1) оказались производные протопорфирина IX: 2,4-ди(1-метоксиэтил)-дейтеропорфирин IX динатриевой соли (димегин) и гематопорфирин IX.

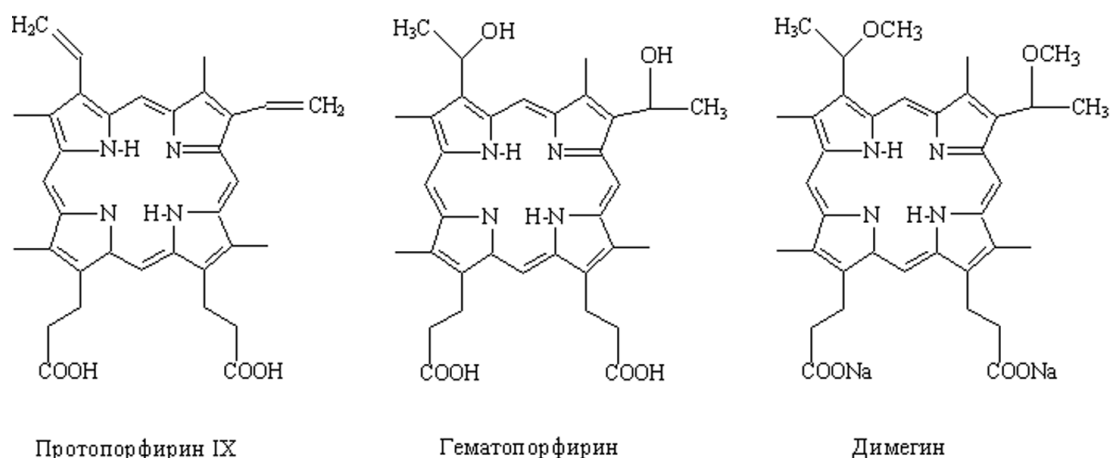


Рисунок 3.

Химические структуры производных протопорфирина IX.

Установлено [101], что димегин и гематопорфирин, также как и YC-1, синергично усиливают активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия. Отмечено, что синергичная активация фермента в комбинации 10 мкМ нитропруссиды натрия и 5 мкМ димегина (или 5 мкМ гематопорфирина) составляет $190 \pm 19\%$ (или $134 \pm 10\%$), соответственно, а в аналогичных экспериментах с YC-1 (3 мкМ) синергичное усиление активации гуанилатциклазы 10 мкМ нитропруссидом натрия равно $255 \pm 19\%$. Обнаружено, что димегин и гематопорфирин не влияют на активацию фермента YC-1 и не изменяют синергичного увеличения стимулированной нитропруссидом натрия активности гуанилатциклазы в присутствии YC-1 [101]; т.е. полученные результаты не позволяют сделать вывод о возможном взаимодействии димегина (или гематопорфирина) с тем же участком гуанилатциклазы, с которым взаимодействует YC-1 [87, 88], поскольку между YC-1 и димегином (или гематопорфирином) отсутствуют какие-либо конкурентные отношения. Выше было отмечено, что YC-1 потенцирует активацию гуанилатциклазы и протопорфирином IX, однако при этом не было отмечено синергичного усиления стимуляции фермента. Полагают, что в основе механизма этого явления лежит стабилизация YC-1 активной конформации фермента [69]. Протопорфирин IX, предшественник гема в организме, является наиболее активным стимулятором фермента в ряду его различных производных. Самыми важными структурными элементами молекулы протопорфирина IX являются гидрофобные винильные боковые цепи в положениях 2 и 4 и полярные боковые остатки пропионовой кислоты в положениях 6 и 7 [102]. Снижение гидрофобности винильных остатков (например, при замене атомов водорода на гидроксильные группы) может ослабить активирующий эффект порфиринов [102]. В наших опытах, однако, замена двух атомов водорода в двух винильных боковых цепях протопорфирина IX на две гидроксильные и две метоксильные группировки в молекулах гематопорфирина и димегина, соответственно, не сказалась на величинах стимулирующих эффектов соединений. Последние были практически одинаковыми [101]. В то же время, эти структурные изменения привели к синергичному усилению NO-зависимой активации гуанилатциклазы этими соединениями в отличие от протопорфирина IX. Объяснить этот факт особенностями химических структур этих соединений пока не представляется возможным. Необходимы дальнейшие исследования. Тем не менее, впервые выявленная способность производных протопорфирина IX, обладающих эндогенной природой, синергично усиливать (аналогично YC-1 хотя и менее эффективно) NO-зависимую активацию гуанилатциклазы указывает на новый, биохимический эффект этих соединений. Этот факт может иметь большое фармакотерапевтическое и физиологическое значение и его следует принимать во внимание.

Еще одним соединением эндогенной природы, обладающим способностью синергично усиливать NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы, оказался адренохром. Адренохром образуется при внутриклеточном аутоокислении катехоламинов (адреналина, норадреналина) супероксид анион радикалом ($O_2^{\bullet -}$) [103, 104]. При нормальных условиях образование $O_2^{\bullet -}$ контролируется действием эндогенной супероксиддисмутазы. При патологических состояниях, связанных с воспалительными процессами, сопровождающимися повреждением тканей, резко возрастает скорость образования $O_2^{\bullet -}$ и защитная система эндогенной супероксиддисмутазы не предотвращает накопления супероксид анион радикала. Это приводит к повреждению биологических макромолекул. Провоспалительные свойства $O_2^{\bullet -}$ радикала вызывают повреждение клеток эндотелия, увеличение проницаемости сосудов [105], усиление перекисного окисления липидов, повреждение ДНК [106], освобождение цитокинов (фактора- α некроза опухоли, интерлейкина- 1β) [107] и образование $ONOO^{\bullet -}$ - мощной цитотоксической молекулы [108]. Все эти нарушения ассоциируются с гипотензией, периферической вазодилатацией, резко сниженным ответом на агенты, регулирующие состояние сосудов [109]. Образующийся при аутоокислении адреналина адренохром резко снижает сосудорасширяющие свойства катехоламинов. При этом падает

ПОТЕНЦИИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ NO

артериальное давление и развивается септический шок [110]. Как известно, избыточное образование оксида азота (NO) приводит к тем же нарушениям. Взаимосвязь между адренохромом и NO практически не исследована. Мы нашли в литературе лишь одно указание о способности адренохрома активировать растворимую гуанилатциклазу почек кролика [111]. Однако, это было еще до установления идентичности NO с ЭДРФ и до “рождения” внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP. Образование адренохрома из адреналина под влиянием $O_2^{\cdot -}$ радикала в условиях *in vivo* и *in vitro* происходит во внутриклеточных органелах: митохондриях и микросомах эндотелиального ретикулума [112, 113]. Проведенные нами исследования по влиянию адренохрома на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека, на стимуляцию фермента прямым NO-донором – спермин-NONO, а также на синергичное усиление NO-зависимой активации фермента в присутствии YC-1, впервые выявило новые интересные данные, касающиеся роли адренохрома в функционировании сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP. Впервые было показано, что адренохром - сильный стимулятор NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы. Он синергично усиливает индуцированную спермин-NONO стимуляцию фермента. Это свойство адренохрома аналогично YC-1. Известно, что основным действием YC-1 и родственных ему соединений является повышение чувствительности гуанилатциклазы к NO, что приводит к сдвигу влево кривой зависимости активации фермента от концентрации NO в присутствии YC-1 [69]. Тот же самый сдвиг влево кривой зависимости от концентрации спермин-NONO активации гуанилатциклазы мы наблюдали и в присутствии увеличивающихся концентраций адренохрома. Молекулярный механизм выявленного синергичного действия адренохрома на активацию растворимой гуанилатциклазы спермин-NONO - не известен. В то же время, мы обнаружили конкурентные отношения между адренохромом и YC-1. Было показано, что адренохром тормозит (на 63%) активацию гуанилатциклазы YC-1. Кроме того, добавление адренохрома практически полностью снимает сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации спермин-NONO в присутствии YC-1 (см. рис. 4).

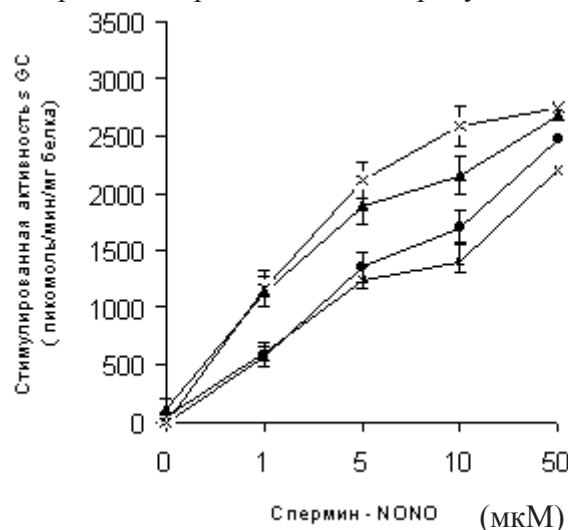


Рисунок 4.

Влияние адренохрома на синергичное усиление активации растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека спермин-NONO в присутствии YC-1. Увеличивающиеся концентрации NO-донора – спермин-NONO в отсутствии (·) или присутствии 3 мкМ YC-1 (●) или 0,1 мкМ адренохрома (×) или 3 мкМ YC-1 после добавления 10 мкМ адренохрома (▲).

Абсцисса: концентрация спермин-NONO в пробе (мкМ).

Ордината: стимулированная спермин-NONO активность рГЦ (пмоль сGMP /мг /мин).

Базальная активность рГЦ составила 153 ± 11 пмоль сGMP /мг /мин. Приведены средние значения из 3-4 независимых экспериментов (\pm средние стандартные отклонения).

Эти результаты не исключают возможности того, что адренохром может взаимодействовать (хотя бы частично) с тем же аллостерическим участком фермента, с которым взаимодействует YC-1. Однако, для доказательства этого необходимы дальнейшие исследования. Впервые выявленное нами свойство адренохрома синергично усиливать (аналогично YC-1, но более эффективно, см. рис. 4) NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы – это новый биохимический эффект адренохрома. Таким образом, адренохром не только снижает или устраняет сосудосуживающее действие адреналина и норадреналина [110], но и резко стимулирует активацию гуанилатциклазы NO-донорами. Это новое свойство адренохрома, аналогичное по своему действию YC-1, показывает, что адренохром может действовать как эндогенный регулятор NO-зависимой активации гуанилатциклазы. Это следует учитывать, особенно, в условиях избыточного образования адренохрома в организме.

Итак, выявление и исследование соединений, аналогичных по своему действию YC-1 и способных синергично усиливать NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы, имеет огромное фармакотерапевтическое и (пато)физиологическое значение. Подобные соединения могут снизить дозы нитровазодилаторов (а, следовательно, уменьшать или устранять их нежелательные побочные эффекты, в том числе и толерантность) без снижения эффективности их лечебного действия. YC-1 и родственные ему соединения (BAY 41-2272, BAY 41-8543, BAY 51-9491) не используются в клинической практике. Однако, результаты опытов на животных показали, что применение YC-1 существенно повышает эффективность действия обычных лекарственных средств, используемых при ишемическом повреждении сердца, обычной и легочной гипертензии, застойной сердечной недостаточности [114]. Поскольку потенцирующее влияние YC-1 на стимуляцию гуанилатциклазы NO наблюдается и при физиологических концентрациях NO порядка от 1 до 100 нМ [115], выявление соединений эндогенной природы, аналогичных по своему действию YC-1, приобретает особое значение. В нормальных условиях образующийся эндогенный NO в присутствии подобных соединений может быть более эффективен в проявлении своих физиологических эффектов. При патологических состояниях накопление эндогенных соединений, обладающих свойствами YC-1 (например, как в случае с адренохромом) может привести к тяжелым последствиям, связанным с резким падением артериального давления и развитием септического шока. Благодаря вездесущей природе внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP передача внутриклеточных и внеклеточных сигналов NO имеет глубокое (пато)физиологическое значение. Так, септический шок и мигрень могут быть обусловлены высокой реактивностью этой системы, тогда как гипертония и астма возникают при низкой реактивности системы [9]. Поэтому, выявление селективных модуляторов (усиливающих или ингибирующих) активность NO - сGMP системы будет способствовать созданию новых высокоэффективных лекарственных средств.

Результаты собственных исследований получены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-48577.)

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palmer R.M.J., Ashton D.S.* (1988) *Nature*, **333**, 664-666.
2. *Murad F.* (1994) *Adv. Pharmacol.*, **26**, 19-34.
3. *Severina I.S.* (1988) *Biochem. Int.*, **17**, 265-278.
4. *Beavo J.A.* (1995) *Physiol. Rev.*, **75**, 725-748.
5. *Hardman J.G., Sutherland E.W.* (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6363-6370.

6. *Ishikawa E., Ishikawa S., Davis Y.W., Sutherland E.W.* (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6371-6376.
7. *Schultz G., Bohme E., Munske K.* (1969) *Life Sci.*, **8**, 1325- 1332.
8. *White A.A., Aurbach G.D.* (1969) *Biochim. Biophys Acta*, **191**, 686-697.
9. *Hobbs A.J.* (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 484-491.
10. *Furchgott R.F., Zawadzki J.V.* (1980) *Nature*, **288**, 373-376.
11. *Ignarro L.J.* (1993) *Thromb. Haemost.*, **70**, 148-151.
12. *Mc Donald L.J., Murad F.* (1995) *Adv. Pharmacol.*, **34**, 263-275.
13. *Arnold W.P., Mittal C.K., Katzuki S., Murad F.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3203-3207.
14. *Trembley J., Gerzer R., Hamet P.* (1988) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **22**, 319-389.
15. *Walter U.* (1984) *Adv. Cycl. Nucl. Protein Phosphoryl. Res.*, **17**, 249-258.
16. *Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian A., Ruitz-Stewart J., Park J., Schultz S., Chepenik K.P., Waldman S.A.* (2000) *Pharmacol. Rev.*, **52**, 375-413.
17. *Северина И.С.* (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 3-30.
18. *Medvedev A., Bussygina O., Pyatakova N., Glover V., Severina I.* (2002) *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 763-766.
19. *Ignarro L.J., Wood K.S.* (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **928**, 160-170.
20. *Gerzer R., Garbers D.L.* (1982) *Fed. Proc.*, **41**, 1410-1413.
21. *Graven R., De Ruberties F.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 310-321.
22. *Ohlstein E.H., Wood K.S., Ignarro L.J.* (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 187-198.
23. *Северина И.С.* (2005) *Биомед. химия*, **51**, 19-29.
24. *Wedel B., Harteneck C., Foester J., Friebe A., Schultz G., Koesling D.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24871-24875.
25. *Foester J., Harteneck C., Malkewitz J., Schultz G., Koesling D.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **240**, 380-386.
26. *Koglin M., Behrends S.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12590-12597.
27. *Mayer B., Koesling D.* (2001) *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 546-548.
28. *Zabel U., Weeger M., La M., Schmidt H.H.H.W.* (1998) *Biochem. J.*, **335**, 51-57.
29. *Lyer L.M., Anantharaman V., Aravind L.* (2003) *BMC Genomics*, **4**, 5.
30. *Nioche, P. Berka V., Vipond J., Minton N., Tsai A.L., Raman C.S.* (2004) *Science*, **306**, 1550-1553.
31. *Pellicena P., Karow D.S., Boon E.M., Marletta M.A.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12854-12859.
32. *Schmidt R.M., Schramm M., Schroder H., Wunder F., Stasch J.P.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 3025-3032.
33. *Wedel B., Humbert P., Harteneck C., Foerster J., Malkewitz J., Bohme E., Schultz G.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2592-2596.
34. *Friebe A., Wedel B., Harteneck G., Foester J., Schultz G., Koesling D.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 1194-1198.
35. *Chinkers M., Garbers D.L.* (1989) *Science*, **245**, 1392-1394.
36. *Krupinski J., Coussen F., Bakalyar H.A., Tang W.J., Fainstein R.G., Orth K., Slaughter C., Reed R.R., Gilman A.G.* (1989) *Science*, **244**, 1558-1564.
37. *Thorpe D.S., Morkin E.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 14717-14720.
38. *Thorpe D.S., Garbers D.L.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 6545-6549.
39. *Wedel B., Harteneck C., Foester J., Friebe A., Schultz G., Koesling D.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24871-24875.
40. *Wilson E.M., Chinkers M.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 4691-4701.
41. *Knowles R.J., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5159-5162.
42. *Garthwaite J.* (1991) *Trends Neurosci.*, **14**, 60-67.
43. *Snyder S.H., Bredt D.S.* (1991) *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 125-128.
44. *Hibbs G.B., Tailor R.E., Varvin Z.* (1987) *Science*, **235**, 473-476.

45. Busse R., Luchoff A., Bassenge E. (1987) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **336**, 566-671.
46. Ignarro L.J., Wood K.S., Wolin M.S. (1984) Adv. Cycl. Nucl. Protein Phosphoryl. Res., **17**, 267-274.
47. Ignarro L.J., Wood K.S. (1987) Biochim. Biophys. Acta, **928**, 160-170.
48. Martin E., Davis K., Bian K., Lee Y.C., Murad F. (2000) Semin. Peritanol., **24**, 2-6.
49. Bredt D.S. (2003) Mol. Pharmacol., **63**, 1206-1208.
50. Ignarro L.J., Adams J.B., Horwitz P.M., Wood K.S. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 4997-5002.
51. Stone J.R., Marletta M.A. (1994) Biochemistry, **33**, 5636-5640.
52. Deninger J.W., Marletta M.A. (1999) Biochim. Biophys. Acta., **144**, 334-350.
53. Ignarro L.J. (1990) Pharmacol. Toxicol., **67**, 1-7.
54. Piriouchou A., Papapetropoulos A. (2005) Cell Signalling, **17**, 407-413.
55. Brunton T.L. (1867) Lancet, 185711, 561-564.
56. Kotz A.Ya., Grafov M.A., Khropov Yu.V., Betin V.L., Belushkina N.N., Bussygina O.G., Yazykova M.Yu., Ovchinnikov I.V., Machova N.N., Medvedeva N.A., Bulargina T.V., Severina I.S. (2000) Br. J. Pharmacol., **129**, 1163-1177.
57. Арзамасцев А.П., Северина И.С., Григорьев Н.Б., Граник В.Г. (2003) Вестник ПАМН, № 12, 88-95.
58. Needleman P., Johnson J.R., (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther., **184**, 709-715.
59. Buchmuller-Rouiller Y., Mauel J., (1991) J. Immunol., **146**, 217-223.
60. Munzel T., Kuiz.S., Heitzer T., Harrison D.G. (1996) Am. J. Cardiol., **77**, 24C-30C.
61. Hussain N.B., Hobbs A.J., Macallister R.J. (1999) Br. J. Pharmacol., **128**, 1082-1088.
62. Straub A., Stasch J.P., Alonso-Alija C., Benet-Buchholts J., Ducre B., Feurer A., Furstner C. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett., **11**, 781-784.
63. Stach 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.
64. Stasch J.R., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowski K., Feurer A., Minuth T., Perzborn E., Schramm M., Straub M. (2002) Br. J. Pharmacol., **135**, 333-343.
65. Stasch J.P., Dembowski K., Perzborn E., Stahl E., Schramm M. (2002) Br. J. Pharmacol., **135**, 344-355.
66. Ko F.N., Wu C.C., Kuo S.C., Lee F. Y., Teng C.M. (1994) Blood, **84**, 4220-4233.
67. Mulsch A., Bauersachs J., Schafer A., Stasch J.P., Kast R., Busse R. (1997) Br. J. Pharmacol., **120**, 681-689.
68. Rothermund L., Friebe A., Paul M., Koesling D., Kreutz R. (2000) Br. J. Pharmacol., **130**, 205-208.
69. Friebe A., Schultz G., Koesling D., (1996) EMBO J., **15**, 6863-6868.
70. Wu C.C., Ko F.N., Kuo S.C., Lee F.Y., Teng C.M. (1995) Br. J. Pharmacol., **116**, 1973-1978.
71. Foester J., Harteneck C., Malkewitz J., Schultz G., Koesling D. (1996) Eur. J. Biochem., **240**, 380-386.
72. Ignarro L.J., Wood K.S., Wolin M.S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2870-2873.
73. Mayer B., Brunner F., Schmidt K. (1993) Eur. Heart J., **14** (Suppl.1) 22-26.
74. Martin E., Lee Y.C., Murad F. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 12938-12942.
75. Mayer B., Koesling D. (2001) Trends Pharmacol. Sci., **22**, 546-548.
76. Kharitonov V.G., Russwurm M., Magde D., Scharma V.S., Koesling D. (1997) Biochim. Biophys. Res. Commun., **239**, 284-286.
77. Friebe A., Koesling D. (1998) Mol. Pharmacol., **53**, 123-127.
78. Hoenicka M., Becker E.M., Apeler H., Sirichoke T., Schroder H., Gerzer R., Stasch J.R. (1999) J. Mol. Med., **77**, 14-23.
79. Mergia E., Mullershausen F., Koesling D. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 24883-24888.
80. Cary S.P., Winger J.A., Marletta M.A. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 13064-13069.

81. *Russwurm M., Koesling D.* (2004) *EMBO J.*, **23**, 4443-4450.
82. *Denninger J., Schelvis J.P., Brandish P.E., Zhao Y., Babcock G.T., Marletta M.A.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 4191-4198.
83. *Galle J., Zabel U., Hubner U., Hatzelman A., Wagner B., Wanner C., Schmidt H.H.* (1999) *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 195-203.
84. *Hurley J.H.* (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 770-777.
85. *Liu Y., Ruoho A.E., Rao V.D., Hurley J. H.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13414-13419.
86. *Tesmer J.J., Sunahara R.K., Gilman A., Sprang S.R.* (1997) *Science*, **278**, 1907-1916.
87. *Friebe A., Russwurm M., Mergis E., Koesling D.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 15253-15257.
88. *Lamothe M., Fur-Jung Change, Balashova N., Shirokov R., Beuve A.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 3039-3048.
89. *Sopkova-De Olivera Santos J., Collot V., Bureau I., Rault S.* (2000) *Acta Crystallogr.*, **C56**, 1035-1036.
90. *Chrisman T.D., Garbers D.L., Parks M.A., Hardman J.G.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 374-381.
91. *Yazawa S., Tsyhita H., Makino R.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21763-21770.
92. *Hobbs A.J.* (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 637-640.
93. *Flamigni F., Facchini A., Stanic I., Tantini D., Denavita F., Stefano C.* (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 319-328.
94. *Lai B., Wang H., Zhan G., Tian G., Jao D., Zhao J., Liu J., Duan L. Pan J.* (1989) *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **11**, 98-100.
95. *Perachi M., Toschi V., Bamonti-Catena F., Lombardi L., Baregg B., Catelezzi A., Colombi M., Maiore A.T., Polli E.E.* (1987) *Blood*, **69**, 1613-1616.
96. *Schmidt H.H.H.W., Lohman S.M., Walter U.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1178**, 153-175.
97. *Chawla R.K., Schlaer S.M., Lawson D.H., Murray T.G., Schmidt F., Shoji M., Nixon D.W., Richmond A., Rudman D.* (1980) *Cancer Res.*, **40**, 3915-3920.
98. *Morbideilli L., Chung-Ho-Chang, Douglas J.G., Granger H.J., Ziche M.* (1996) *Am. Physiological Society*, H411-H415.
99. *Clo C., Fantini B., Pignalli C., Guarnieri C., Calderera C.M.* (1963) *Adv. Polyamine Res.*, **4**, 667-681.
100. *Северина И.С., Пятакова Н.В., Щеголев А.Ю.* (2007) *Биомед. химия*, **53**, 44-49.
101. *Северина И.С., Пятакова Н.В., Щеголев А.Ю., Пономарев Г.В.* (2006) *Биохимия*, **71**, 426-431.
102. *Ignarro L.J., Ballot B., Wood K.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **259**, 6201-6207.
103. *Bindoli A., Deeble D.J., Rigobello M.P., Galzinga L.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1016**, 349-35
104. *Bindoli A., Scutari G., Rigobello M.R.* (1999) *Neurotox. Res.*, **1**, 71-80.
105. *Expludes I.V., Whittle B.J.* (1989) *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 185-192.
106. *Dix T.A., Hess K.M., Medina M.A., Sullivan R.W., Tilly S.L., Webb T.L* (1996) *Biochemistry*, **35**, 4578-4583.
107. *Salvemini D., Wang Z.O., Atern M.K., Currie M.G., Misko T.P.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2659-2663.
108. *Volk T., Gerst J., Faust-Belbe G., Stroemann A., Kox W.J.* (1999) *Inflamm. Res.*, **43**, 544-549.
109. *Saffredini A.F., From R.E., Parker M.M., Brenner M., Kovags J.A., Wesley R.A., Parrilo J.E.* (1989) *N. Engl. J. Med.*, **321**, 280-287.
110. *Macarthure M., Westfall T.C., Riley D.R., Misko T.B., Salvemini D.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9753-9758.
111. *Liang C.T., Sacktor B.* (1978) *J. Cycl. Nucl. Res.*, **4**, 97-111.
112. *Laegreid W.W., Breeze R.G.* (1985) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **47**, 387-397.

-
113. Kong L.Y., Jiang Q.G., Qu Qs. (1989) Biomed. Environ. Sci., **2**, 72-77.
114. Doggrell S.A. (2005) Curr. Opin Investig Drugs, **6**, 874-878.
115. Varner P.D., Beckman J.S. (1995) In Nitric oxide in Nervous System (Vincent S.R. ed.) Academ. Press. London UK, pp.191-206.

Поступила: 15. 12. 2006.

**NITRIC OXIDE. POTENTIATION OF NO-DEPENDENT ACTIVATION OF SOLUBLE
GUANYLATE CYCLASE - (PATHO)PHYSIOLOGICAL AND
PHARMACOTHERAPEUTICAL SIGNIFICANCE**

I.S. Severina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10,
Moscow, 119121 Russia; fax: (495) 245-0857; e-mail: irina.severina@ibmc.msk.ru

The paper reviews the molecular mechanism underlying the physiological effects of nitric oxide (NO), the role of the signalling system: NO-soluble guanylate cyclase-cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP) in the realization of NO action. The data concerning the basic chemical characteristics of guanylate cyclase, such as the subunits structure, isoforms, modern concepts of the catalytic and regulatory centers of the enzyme are presented. The role of guanylate cyclase heme and the enzyme itself in the realization of physiological effects of NO is demonstrated. The data concerning a new NO-independent, allosteric activator of soluble guanylate cyclase, YC-1 (benzyl indasol derivative) synergistically increased the NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase are presented. The data on guanylate cyclase sites responsible for binding of the enzyme with YC-1 and possible molecular mechanism underlying the synergistic increase of NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 are presented. New compounds of endogenous nature capable to potentiate and synergistically increase the activation of guanylate cyclase by NO-donors have been revealed and investigated. The important physiological, pharmacotherapeutical and pathophysiological significance of this new fact is discussed.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxide, YC-1, potentiation of activation.