

УДК 577.152.6
©Пятакова, Северина

РАСТВОРИМАЯ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗА В МОЛЕКУЛЯРНОМ МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Н.В. Пятакова, И.С. Северина**

Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Погодинская ул., 10, 119121 Москва;
факс: (499)245-0857; эл. почта: irinok.severina@yandex.ru

Исследовано влияние амброксола-муколитического препарата- на активность растворимых гуанилатциклаз из тромбоцитов человека и легких крысы и активацию ферментов NO-донорами – нитропруссидом натрия и Sin-1. Амброксол в интервале концентраций от 0,1 до 10 мкМ не влияет на базальную активность ферментов, но тормозит индуцированную нитропруссидом натрия активность обоих ферментов с величинами IC_{50} равными 3,9 и 2,1 мкМ для гуанилатциклаз из тромбоцитов человека и легких крысы, соответственно. Амброксол не влияет на стимуляцию ферментов протопорфирином IX.

Исследовано влияние антималярийного средства - артемизинина - на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента NO-донорами. Артемизинин (0,1-100 мкМ) не влияет на базальную активность тромбоцитарной гуанилатциклазы, но тормозит индуцированную нитропруссидом натрия стимуляцию фермента с величиной IC_{50} равной 5,6 мкМ. Артемизинин (10 мкМ) тормозит также (на $71 \pm 4,0\%$) активацию фермента тиол-зависимым NO-донором - 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазоло-2-оксидом, но не влияет на стимуляцию фермента протопорфирином IX. Сделано заключение о вовлечении внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза - cGMP в молекулярный механизм терапевтического действия амброксола и артемизинина.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота (NO), амброксол, артемизинин.

ВВЕДЕНИЕ. Установление эндогенной природы оксида азота (NO), оказавшегося идентичным эндотелиальному фактору релаксации (ЭДФР), имело фундаментальное значение и позволило по-новому подойти к пониманию молекулярного механизма многих физиологических процессов в клетке

Эндогенный NO образуется из L-аргинина за счет окисления аминогруппы гуанидинового фрагмента под действием L-аргинин-NO-синтазы [1].

* - адресат для переписки

Основным внутриклеточным рецептором оксида азота является растворимая гуанилатциклаза, катализирующая биосинтез циклического гуанозин 3',5'-монофосфата (сGMP) - вторичного посредника, мощного регулятора метаболизма клетки, в значительной степени определяющего её функции [2]. Большинство эффектов оксида азота осуществляется через стимуляцию растворимой гуанилатциклазы и накопление сGMP.

Способность свободного радикала NO активировать гуанилатциклазу была обнаружена еще в 70-е годы прошлого века. Однако, в то время считалось, что биосинтез NO ограничен 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 появилась внутриклеточная сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - сGMP [3]. Активация гуанилатциклазы повышает уровень сGMP, который в свою очередь определяет различные стороны функций клетки через взаимодействие со специфическими киназами, ионными каналами и фосфодиэстеразой [4, 5]. Этот путь передачи сигналов лежит в основе большого числа физиологических эффектов, приписываемых NO и являющихся важными в регуляции сердечно-сосудистой, лёгочной, нервной и иммунной систем.

Важная роль повсеместно распространенной сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - сGMP в функции клеток, нарушение активности этой системы при многих патологических состояниях (гипертония, сердечно-сосудистые заболевания, 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 могли бы использоваться в качестве терапевтических средств. Что касается заболеваний, связанных с дефицитом образования эндогенного NO (гипертония, сердечная недостаточность и др), то в настоящее время имеется целый арсенал новых доноров NO [6]. 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 [3]. Недавно предложенный ингибитор NO-зависимой активации [Н-1,2,4-оксадиазоло-[4,3-d]-хиноксалин-1 (ODQ [7] на самом деле оказался ингибитором гем-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы [8].

1. РОЛЬ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ДЕЙСТВИИ АМБРОКСОЛА (МУКОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА).

Амброксол успешно используется в настоящее время при лечении астмы и других воспалительных процессов в дыхательных путях, характеризующихся избыточным образованием оксида азота [9]. Амброксол (lasolvan) производное алкалоида визицин, является активным метаболитом бромгексина (bisolvan). Интенсивное образование NO при этих патологических состояниях обусловлено экспрессией индуцибельной NO-синтазы [10], которая сопровождается резким повышением активности растворимой гуанилатциклазы и накоплением сGMP [11].

Для изучения возможного биохимического механизма терапевтического действия амброксола мы исследовали влияние амброксола на активность растворимой гуанилатциклазы и активацию фермента NO-донорами (нитропруссидом натрия и сиднонимин-1 (Sin-1), используя для этой цели растворимые гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и лёгких крысы [12].

Было показано, что амброксол в диапазоне концентраций от 10^{-7} до 10^{-5} М не влияет на базальную активность растворимых гуанилатциклаз, но тормозит NO-зависимую активацию ферментов нитропруссидом натрия. Результаты представлены на рисунке 1.

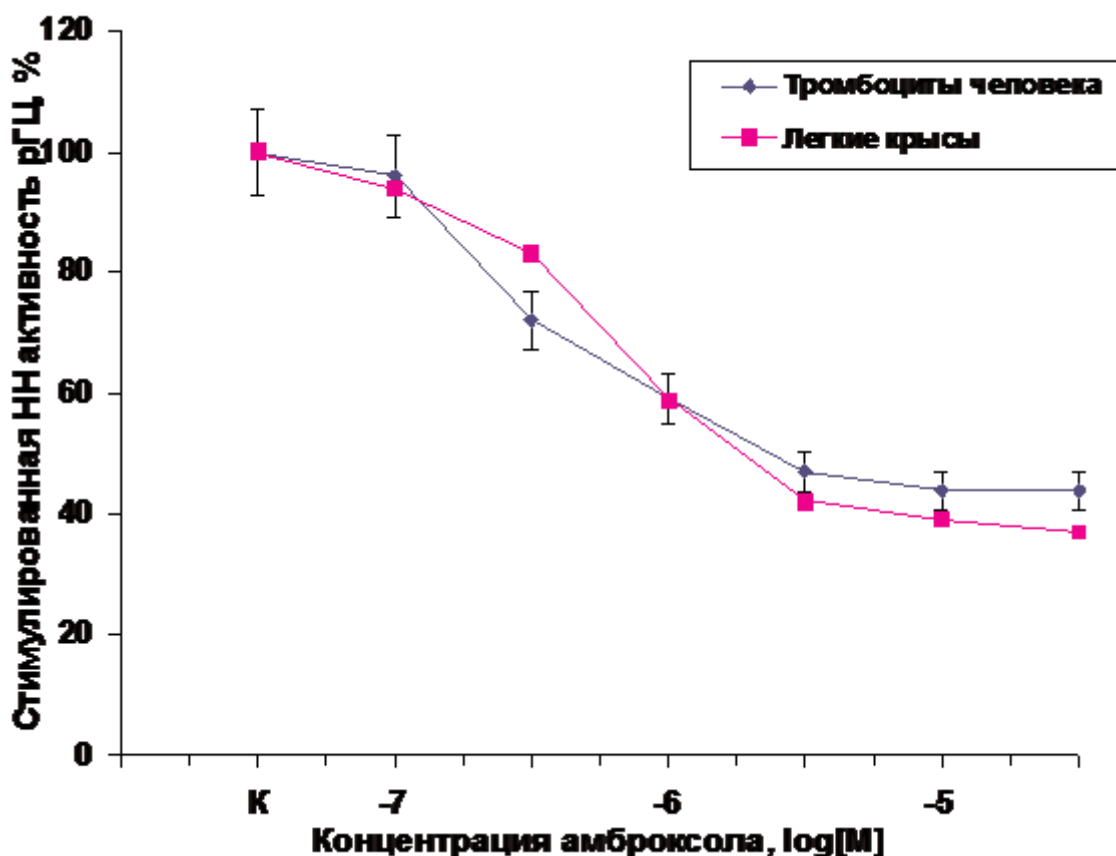


Рисунок 1.

Влияние амброксола на стимулированную нитропруссидом натрия активность растворимой гуанилатциклазы из тромбоцитов человека (●) и лёгких крысы (■).

Активность растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) определяли в присутствии 100 мкМ нитропруссид натрия (НН) и в отсутствии (К) и в присутствии амброксола (0,1-50 мкМ). Абсцисса: концентрация амброксола в пробе (log M) Ордината: стимулированная НН активность гуанилатциклазы в отсутствии амброксола (К) принята за 100%. Базальная активность гуанилатциклазы из тромбоцитов человека лёгких крысы равны 152 ± 16 и $18 \pm 1,8$ пмоль cGMP/мин/мг белка, соответственно. Гуанилатциклазная активность из тромбоцитов человека и лёгких крысы в присутствии 100 мкМ нитропруссид натрия равна 1733 ± 140 и $41,3 \pm 2,8$ пмоль cGMP/ мин /мг белка соответственно. Представлены средние значения из трёх независимых экспериментов \pm средние стандартные отклонения.

Из рисунка видно, что в обоих случаях амброксол (в интервале концентраций от 10^{-7} до 10^{-5} М) ингибирует стимуляцию фермента нитропруссидом натрия с величинами IC_{50} равными 3,9 и 2,1 мкМ для гуанилатциклаз из тромбоцитов человека и легких крысы, соответственно. Амброксол также тормозит (на $73 \pm 5\%$) активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека Sin-1, другим NO-донором. Торможение амброксолом NO-зависимой активации гуанилатциклазы подтвердилось и в серии независимых экспериментов по исследованию влияния амброксола на стимуляцию гуанилатциклазной активности протопорфирином IX. Протопорфирин IX – непосредственный предшественник гема, является эндогенным активатором растворимой гуанилатциклазы. Однако, в отличие от NO, для активации которым необходимо присутствие гема гуанилатциклазы, последний не участвует в стимуляции фермента протопорфирином IX [13]. Активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека в присутствии протопорфирина IX (5 мкМ) без и после добавления амброксола (10 мкМ)

составляет 428 ± 25 и 403 ± 20 пмоль cGMP/ мин/ мг белка. Эти данные указывают, что молекулярный механизм терапевтического действия амброксола включает в себя ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы.

Впервые выявленная способность амброксола избирательно тормозить NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы, а также обнаруженная аналогия в интенсивности ингибирования амброксолом активации NO-донором (нитропруссидом натрия) двух гуанилатциклаз (из тромбоцитов человека и лёгких крысы) (см. рис. 1) показали, 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.

Известно, что эндогенный NO играет важную роль в регуляции физиологических процессов в дыхательных путях [14]. NO участвует в регуляции легочного кровообращения [15], в выделении бронхиального секрета, образование которого и его транспорт является важным механизмом нормального функционирования дыхательных путей.

Полагают, что эндогенный NO тормозит секрецию слизи. В то же время, при генерировании NO в больших количествах благодаря экспрессии индуцибельной NO-синтазы, резко увеличивается секреция слизи и повышается ее плотность [16]. Сообщалось также, что увеличение мокроты стимулировалось повышением уровня cGMP [17].

Возникает необходимость в новых фармакологических средствах, которые снижали бы повышенную плотность слизи и улучшали бы муколитический транспорт бронхиального секрета. Амброксол относится как раз к муколитическим препаратам, которые способствуют разжижению мокроты, улучшению mukосилиарного транспорта бронхиального секрета.

Поскольку воспалительные процессы в дыхательных путях у людей больных астмой сопровождаются экспрессией индуцибельной NO-синтазы было выдвинуто представление о возможности создания новых препаратов на основе ингибиторов NO-синтазы [11]. Полученные же нами данные о торможении амброксолом NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы [12], впервые указывают на возможность создания новых муколитических средств на основе ингибиторов NO-зависимой активации гуанилатциклазы. Эти лекарственные препараты подавляли бы избыточное образование NO, но не снижали бы уровня оксида азота, необходимого для регуляции нормальных физиологических функций дыхательного тракта.

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод о вовлечении внутриклеточной сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP в механизм терапевтического действия амброксола и указывают на перспективность создания новых, эффективных, муколитических средств на основе ингибиторов NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы.

В связи с последним заключением следует обратить внимание на впервые выявленную и исследованную нами способность карнозина, эндогенного дипептида (β -аланил-L-гистидина), избирательно блокировать NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы [18]. Благодаря этим данным возникает возможность использования карнозина в качестве лечебного средства при патологических состояниях, связанных с избытком генерирования NO в организме и усилением активности растворимой гуанилатциклазы (например, при астме).

Следует подчеркнуть, что карнозин нетоксичен, удобен для применения в клинической практике [19]. Соединение полностью метаболизируется в организме человека и не накапливается в органах млекопитающих при длительном применении. Известно, что карнозин уже применяется в качестве лекарственного средства в офтальмологии [20, 21], при язвенном кератите, лучевой терапии [19].

Однако, более широкое его применение пока ограничено. В основном, это связано с недостаточной изученностью его биологической активности. Возможно, что впервые выявленная нами способность карнозина селективно ингибировать NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы [18], привлечёт к нему более пристальное внимание биохимиков, фармакологов, клиницистов и расширит область его применения в клинической практике.

2. РОЛЬ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ДЕЙСТВИИ АРТЕМИЗИНИНА (АНТИМАЛЯРИЙНОГО ПРЕПАРАТА).

Следующим лекарственным препаратом, в механизм терапевтического действия которого, могла быть вовлечена сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP, является антималярийный препарат – артемизинин. Малярия широко распространена во многих регионах мира. Отсутствие вакцин и опасность развития устойчивости к используемым антималярийным средствам настойчиво требует создания новых антималярийных препаратов. Артемизинин, выделенный из экстрактов *Artemisia annua* и относящийся к группе эндопероксид содержащих сесквитерпеноидов, применяется при лечении малярии [22, 23]. В отличие от многих других антималярийных препаратов артемизинин эффективен против форм этого заболевания устойчивых к препаратам 4-аминохинолина [24].

Роль гуанилатциклазы при малярийной интоксикации изучена недостаточно. Ранее было показано [25], что cGMP может участвовать в индукции эксфлагелляции (образование микрогамет у малярийного плазмоида). Обработка крови мышей *P. berghei* cGMP или агентами, которые повышают уровень cGMP (например, нитропруссидом натрия, сильного активатора гуанилатциклазы) увеличивает эксфлагелляцию, тогда как 4-метилгидроксиламин (ингибитор гуанилатциклазы) тормозит образование гаметоцитов (гаметогенезис) [25].

Роль оксида азота в патогенезе развития малярии, несмотря на многочисленные исследования, не выяснена. Существующие по этому вопросу точки зрения достаточно разноречивы [25-32]. Недавно было показано, что эритроциты человека, зараженные *P. falciparum*, синтезируют большое количество NO, по-видимому, благодаря индукции специфической изоформы NO-синтазы (NOS), отличающейся от тех форм фермента, которые найдены в клетках млекопитающих [33]. В этой связи представляет особый интерес тот факт, что гемовая часть малярийного пигмента (бета-гематин) опосредует ингибирование избыточного образования NO [34]. Возможно, этот факт объясняет противоречивость данных, касающихся генерирования NO при малярии и роли оксида азота при этом заболевании.

Хотя молекулярный механизм антималярийного действия артемизинина не выяснен фармакологический эффект препарата связывают с взаимодействием соединения с гемом (феррипротопорфирином IX) или гемом (ферропротопорфирином IX). Малярийный токсин *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) [35]. Предполагают, что взаимодействие гемозоина с гемом тормозит образование гемозоина и определяет эффективность антималярийного действия артемизинина [36]. Следует заметить, что целый ряд соединений (в том числе и метиленовый синий), способные связываться с гемом обладают антималярийной активностью [37, 38].

Известно, что метиленовый синий ингибирует активацию растворимой гуанилатциклазы NO-донорами [39]. Для изучения возможной роли растворимой гуанилатциклазы в механизме фармакологического действия артемизинина мы исследовали влияние последнего на активацию растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека NO-генерирующими соединениями, относящихся к различным химическим классам: нитропруссидом натрия, сиднонимом (Sin-1) и производным фуросана – 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазол-2-оксидом.

ГУАНИЛАТЦИКЛАЗА В ДЕЙСТВИИ ЛЕКАРСТВ

Артемизинин в интервале концентраций от 0,1 до 100 мкМ не влияет на базальную активность тромбоцитарной гуанилатциклазы, но тормозит активацию фермента NO-донором - нитропруссидом натрия. Результаты представлены на рисунке 2.

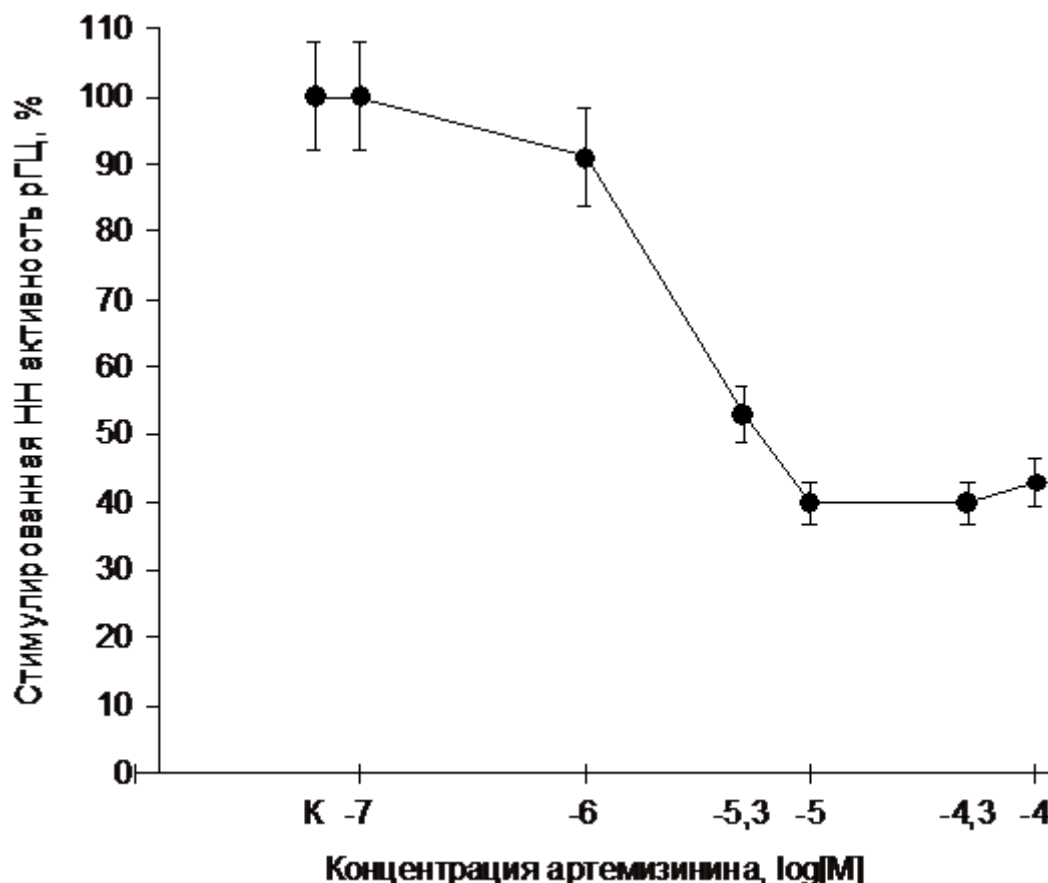


Рисунок 2.

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

Активность растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) определяли в присутствии 100 мкМ нитропруссида натрия (НН) и в отсутствие (К) и в присутствии артемизинина (0,1-100 мкМ).

Абсцисса: концентрация артемизинина в пробе (log M).

Ордината: стимулированная нитропруссидом натрия активность в отсутствие артемизинина (К) принята за 100%. Базальная активность была равна 93 ± 13 пмоль cGMP/ мин/мг белка.

Гуанилатциклазная активность в присутствии 100 мкМ нитропруссида натрия составляла 1088 ± 110 пмоль cGMP/мин /мг белка. Представлены средние значения из четырёх независимых экспериментов \pm средние стандартные отклонения.

Из рисунка 2 видно, что артемизинин концентрационно-зависимым образом ингибирует индуцированную нитропруссидом натрия (100 мкМ) активацию гуанилатциклазы с величиной IC_{50} равной 5,6 мкМ. Артемизинин в конечной концентрации 10 мкМ тормозит также активацию фермента и другими NO-донорами: Sin-1 (10 мкМ) на $87 \pm 7\%$ и 3,4-дициано-1,2,5-оксадиазоло-2-оксидом (10 мкМ) 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 [40]. Активность тромбоцитарной гуанилатциклазы в присутствии протопорфирина IX (5 мкМ) без и после добавления артемизинина (10 мкМ) равнялась 371 ± 30 и 393 ± 20 пмоль cGMP/мин/мг белка [41].

Способность артемизинина ингибировать активацию гуанилатциклазы NO-донорами, но не протопорфирином IX предполагает участие гема гуанилатциклазы. С другой стороны известно, что при взаимодействии артемизинина с гемом происходит восстановление эндопероксидной группы этого сесквитерпеноида, которое приводит к образованию свободных кислородных радикалов (O_2^-) [42, 43]. Для выяснения этого мы исследовали влияние супероксиддисмутазы и каталазы на ингибирование артемизинином индуцированной нитропруссидом натрия активации гуанилатциклазы. Результаты представлены в таблице

Из таблицы видно, что ни супероксиддисмутаза, ни каталаза не влияют на ингибирующий эффект артемизинина. Торможение артемизинином (10 мкМ) без, и в присутствии супероксиддисмутазы (167 ед/мл) или катазазы (127 ед/мл) составляет $60 \pm 3,6$, $58 \pm 2,9$ и $63 \pm 4\%$, соответственно.

Таблица. Влияние супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы на торможение артемизинином (10 мкМ) стимулированной нитропруссидом натрия (НН 100 мкМ) активности растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека (рГЦ).

Соединения и добавки	Стимулированная НН активность рГЦ (пмоль cGMP/мин/мг белка)
НН	642±6
НН + артемизинин	255±15
НН + артемизинин + СОД (167 ед мл)	270±14
НН + артемизинин + каталаза (127 ед мл)	240±17

Примечание. Величины удельной активности представлены как средние значения из трёх независимых экспериментов \pm средние стандартные отклонения.

Итак, хотя молекулярный механизм выявленного нами ингибиторного эффекта артемизинина окончательно не выяснен, ингибирование артемизинином активации растворимой гуанилатциклазы NO-донорами, относящихся к различным химическим классам, и отсутствие его влияния на стимуляцию фермента протопорфирином IX указывает на участие гема гуанилатциклазы в этом процессе. Данные о роли NO при малярии противоречивы (как уже указывалось выше) и не позволяют сделать окончательный вывод о биохимическом механизме терапевтического действия артемизинина. В то же время, следует заметить, что ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы артемизинином наблюдается при его терапевтических концентрациях в интервале от 0,2 до 12,8 мкМ [43]. Величина IC_{50} для артемизинина, определенная нами (5,6 мкМ), как раз находится в интервале этих концентраций. Это предполагает, что действие этого антималярийного средства включает в себя ингибирование NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы [44].

Следует заметить, что при фармакологической оценке обнаруженного нами эффекта артемизинина, обращает на себя внимание тот факт, что в ряде случаев протекание вызванной *P. falciparum* малярии характеризуется патофизиологическим состоянием, выражающимся в сильной системной вазодилатации, что может приводить к летальным исходам [45, 46]. 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 [47, 48]. 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.

В заключение следует заметить, что совокупность представленных данных позволяет сделать вывод о вовлечении внутриклеточной сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP в механизм терапевтического действия антималярийного препарата – артемизинин.

3. РОЛЬ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ДЕЙСТВИИ СТРЕПТОНИГРИНА (ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА).

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 [49, 50]. С другой стороны, NO может защищать клетки от гибели в результате избыточного образования NO [51]. Влияние NO на рост опухоли также противоречиво и зависит от целого ряда факторов: типа опухоли, стадии развития, уровня NO и используемой терапии [52]. Было показано, что в условиях *in vitro* образование NO повышает эффективность ряда химиотерапевтических препаратов [53], тогда как торможение биосинтеза NO рядом медикаментозных средств (например, 5-фторурацилом) снижает пролиферацию некоторых опухолевых клеток [54].

Недавно было показано, что сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP влияет на выживаемость пролиферирующих клеток L1210.1-H [1,2,4]-оксадиазоло-[4,3-*d*]-хиноксалин-1 (ODQ) - ингибитор растворимой гуанилатциклазы - вызывает заметное усиление каспазной активности, которая ассоциирует с потерей жизнеспособности клеток и снижением содержания cGMP [55], а YC -1 (аллостерический активатор растворимой гуанилатциклазы) и 8-Br cGMP (проникающий в клетки аналог cGMP) предупреждает апоптоз [55]. Метиленовый синий (известный ингибитор NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы) также тормозит рост лейкемических клеток L 1210 и P388. Ранее было показано, что противоопухолевый антибиотик стрептонигрин (брунеомицин) тормозит рост лейкемических клеток L1210 [56, 57]. 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 [58]. 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 [3, 59]. 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) [59]. Результаты исследования показали, что стрептонигрин (0,1-5 мкМ) не влияет на базальную активность растворимой гуанилатциклазы, но ингибирует зависимую от концентрации стрептонигрина активацию фермента нитропруссидом натрия с величиной IC₅₀ 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. Эти данные предполагают участие гема гуанилатциклазы в ингибирующем эффекте стрептонирина. Все использованные производные стрептонирина, различающиеся заместителями в положении 2' центрального пиридинового фрагмента, но сохраняющие в молекуле фармакофорный фрагмент, отвечающий за цитотоксический эффект соединения [59], также как и стрептонирин, ингибировали NO-зависимую активацию гуанилатциклазы. Следует отметить, что величины ингибирующих эффектов соединений варьировали от 26 до 85% в зависимости от их структуры. Однако, отсутствие корреляции между ингибированием NO-зависимой активации фермента и цитотоксическим эффектом соединений [59], по-видимому, исключает прямое участие растворимой гуанилатциклазы в молекулярном механизме противоопухолевого действия стрептонирина [59].

Итак, в случае муколитического препарата – амброксола и антималярийного средства – артемизинина мы считаем, что сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP является вовлеченной в механизм терапевтического действия этих лекарств, тогда как для противоопухолевого препарата – стрептонирина - это исключено.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) *Nature*, **327**, 5524-5526.
2. Murad F. (1994) *Adv. Pharmacol.*, **26**, 19-39.
3. Hobbs A.J. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 484-491.
4. Hobbs A.J., Ignarro L.J. (1996) *Methods Enzymol.*, **269**, 134-148.
5. Dusse R., Luchoff A., Bassenger E.. (1987) *Naunyn-Schmiedebergers Arch. Pharmacol.* **336**, 566-571.
6. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. (2004) В кн.: Оксид азота (NO) Новый путь к поиску лекарств. Из-во "Вузовская книга" сс. 44-196.
7. Carthwaite J., Southam E., Boulton G.L., Nielsen E.B., Schmidt R., Mayer B. (1995) *Mol. Pharmacol.*, **48**, 184-188.
8. Schreammel A., Behrends S., Schmidt K, Koesling D., Mayer B. (1996) *Mol.. Pharmacol.*, **50**, 1-5.
9. Barnes J.P., Bellvisi M.J. (1993) *Torax*, **48**, 1034-1043.
10. Kharitonov S.A., Yates D.H., Robbins R.A., Logan-Sinclar R., Sinebourne E., Barnes P.J. (1994) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, 842-849.
11. Barnes P.J. (1995) *Ann. Med.*, **27**, 389-393.
12. Severina I.S., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Khropov Yu.V., Krasnoperov R.A. (2000) *Eur. J. Pharmacol.*, **407**, 61-64.
13. Ignarro L.J., Wood K.S., Wolin M.S. (1984) *Adv. Cycl. Nucl. Protein Phosphoryl. Res.*, **17**, 267-274.
14. Belvisi M.G., Ward J.K., Barnes P.J. (1995) *Arch. Intern. Pharmacol. Ther.*, **329**, 97-110.
15. Barnes P.J., Lui S.H. (1995) *Pharmacol. Rev.* **47**, 87-131.
16. Adler R.K.B., Fisher B.M., Li H., Choe N.H., Whright D.I. (1995) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **13**, 326-330.
17. Brown J.F., Keates A.C., Habson P.J., Whittle B.J.R. (1993) *Am. J. Physiol.*, **265**, G418-G422.
18. Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.А. (2000) *Биохимия*, **65**(7), 921-927.
19. Болдырев А.А. (1998) в кн.: "Карнозин. Биологическое значение и возможное применение в медицине" Из-во МГУ, Москва, сс. 252-269.
20. Babizhaev M.A. (2009) *Drug Metabol. Drug Interact.*, **24**(2-4), 275-323.
21. Babizhaev M.A. (2010) *Am. J. Ther.*, **17**(4), 373-389.

22. *Klayman D.L.* (1995) *China Science*, **228**, 1049-1055.
23. *Ambroise-Thomas P.* (1999) *Bull. Acad. Natl. Med.*, **183**, 797-810.
24. *Benoit-Vical F., Robert A., Meunier B.* (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2555-2558.
25. *Kawamoto F., Alejo-Blanco R., Fleck S.L., Kawamoto Y., Sinden R.E.* (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **42**, 101-108.
26. *Farre N., Riffel B., Rudin W.* (1999) *Parasitology*, **119**, 139-143.
27. *Dondorn A.M., Planche T., de-Bel E.E., Angus B.J., Chotivanich K.T., Silamut K., Rumijn J.A., Ruangvecrayuth R., Hoch F.J., Kager P.A., Vreeken J., White N.J.* (1998) *Am. J. Trop. Mol. Hyg.*, **59**, 497-502.
28. *Jones I.W., Thomsen L.L., Knowles R., Gutteridge W.E., Butcher G.A., Sinden R.E.* (1996) *Parasite Immunol.*, **18**, 535-538.
29. *Jacobs P., Radzioch D., Stevenson M.M.* (1995) *J. Immunol.*, **155**, 5306-5313.
30. *Seguin M., Klitz F.M., Schneider I., Weir J.P., Goodbary M., Slayter M., Raney J.J., Aniadolu J.U., Green S.S.J.* (1994) *J. Exp. Med.*, **180**, 353-358.
31. *Asensio V.C., Oshima H., Falang P.B.* (1993) *Exp. Parasitol.*, **77**, 111-117.
32. *Rockett K.A., Awburn M.M., Cowden W.B., Clark I.A.* (1991) *Infect. Immun.*, **59**, 3280-3283.
33. *Ghigo D., Todde R., Ginsburg H., Costamang C., Gautret R., Bussolino E., Ulliers D., Giribaldi G., Deharo E., Gabrielli G.* (1995) *J. Exp. Med.*, **182**, 677-688.
34. *Taramelli D., Basilico N., Pagani E., Grande R., Monti D., Chione M., Olliaro P.* (1995) *Exp. Parasitol.*, **81**, 501-511.
35. *Goldberg D., Slater A.F., Cerami A., Henderson G.B.* (1990) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2931-2935.
36. *Robert A., Meunier B.* (1997) *J. Am. Chem.*, **119**, 5968-5969.
37. *Ignatiahchenko M.V., Winter R.W., Bachinger H.P., Hinrichs D.J., Riscoll M.K.* (1997) *FEBS Lett.*, **409**, 67-73.
38. *Atamna H., Krugliak M., Shalmiev G., Deharo E., Pescarmona G., Ginsburg H.* (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 693-700.
39. *Gruetter C.A., Kadowitz P.J., Ignarro L.J.* (1981) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 150-156.
40. *Ignarro L.J.* (1992) *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 465-469.
41. *Severina I.S., Pyatakova N.V., Bussygina O.G., Mikhailitsyn F.S., Khropov Yu.V.* (2002) *Eur. J. Pharmacol.*, **438**, 69-71.
42. *Jefford C.W., Vicente M.G.H., Jacquier V., Favarger F., Mareda J., Millasson-Schmidt P., Brummer G., Burger U.* (1996) *Helv. Chim. Acta*, **79**, 1475-1487.
43. *Cumming J.N., Ployradith P., Posner G.H.* (1997) *Adv. Pharmacol.*, **37**, 293-297.
44. *Schildbach S., Wernsdorfer W.H., Suebsaeng L., Rooney W.* (1990) *Southeast Asian J. Med. Public Health*, **21**, 29-38.
45. *Charoenpan P., Indrapasit S., Kiatboonsri S., Suvachitanant O., Tanomsup S.* (1990) *Chest*, **97**, 1190-1197.
46. *Bruneel F., Gachor B., Timsit J.F., Wolff M., Bedos J.P., Regnier B., Vacon F.* (1997) *Intensive Care Med.*, **23**, 698-701.
47. *Driscoll W., Thurin S., Carrion V., Steinhorn R.H., Morin III F.C.* (1996) *J. Pediatr.*, **129**, 904-908.
48. *Brown G., Frankl D., Phang T.* (1996) *Postgrad. Med. J.*, **72**, 612-614.
49. *Shimojo T., Hiroe M., Ishiyama S., Ike H., Nishikawa T., Marumo F.* (1999) *Exp. Cell Res.* **247**, 36-47.
50. *Ward C., Wong T.H., Rahman I., Haslett C., Chilvers E.R., Rossi A.G.* (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 305-314.
51. *Tippeswamy T., Morris R.* (1997) *Brain Res.*, **774**, 116-122.
52. *Wink D.A., Vodovotz Y., Cook J.A., Krishna M.C., Kim S., Coffin D., DeGraff W., Dehica A.M., Liebman J., Mitchell J.B.* (1998) *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 802-809.

53. 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.
54. Jin Y., Heck D.E., DeGeorge G., Tian Y., Laskin J.D. (1996) Cancer Res., **56**, 1978-1982.
55. Flamigni F., Facchini A., Stanie I., Tantini B., Bonavita F., Stefanelli C. (2001) Biochem. Pharmacol., **62**, 319-328.
56. Шорин В.А. Бажанов В.С. (1974) Антибиотики, **19**, 679-684.
57. Boger D.I., Yasuda M., Mitcher L.A., Drakr S.D., Thompson S.C. (1987) J. Med. Chem., **30**, 1918-1928.
58. Bozan A.D., Bianchi M.S., (2001) Mutat. Res., **488**, 25-37.
59. Severina I.S., Pyatakova N.V., Preobrazhenskaya M.N., Khropov Yu.V. (2004) Eur. J. Pharmacol., **483**, 127-132.

Поступила: 06. 06. 2011.

SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE IN THE MOLECULAR MECHANISM UNDERLYING THE THERAPEUTIC ACTION OF DRUGS

N.V. Pyatakova, I.S. Severina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (099)245-0857; e-mail: irinok.severina@yandex.ru

The influence of ambroxol - a mucolytic drug - on the activity of human platelet soluble guanylate cyclase and rat lung soluble guanylate cyclase and activation of both enzymes by NO-donors (sodium nitroprusside and Sin-1) were investigated. Ambroxol in the concentration range from 0.1 to 10 μ M had no effect on the basal activity of both enzymes. Ambroxol inhibited in a concentration-dependent manner the sodium nitroprusside-induced human platelet soluble guanylate cyclase and rat lung soluble guanylate cyclase with the IC₅₀ values 3.9 and 2.1 μ M, respectively. Ambroxol did not influence the stimulation of both enzymes by protoporphyrin IX.

The influence of artemisinin - an antimalarial drug - on human platelet soluble guanylate cyclase activity and the enzyme activation by NO-donors were investigated. Artemisinin (0.1-100 μ M) had no effect on the basal activity of the enzyme. Artemisinin inhibited in a concentration-dependent manner the sodium nitroprusside-induced activation of human platelet guanylate cyclase with an IC₅₀ value 5.6 μ M. Artemisinin (10 μ M) also inhibited (by 71 \pm 4.0%) the activation of the enzyme by thiol-dependent NO-donor the derivative of furoxan, 3,4-dicyano-1,2,5-oxadiazolo-2-oxide (10 μ M), but did not influence the stimulation of soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. It was concluded that the sygnalling system NO-soluble guanylate cyclase-cGMP is involved in the molecular mechanism of the therapeutic action of ambroxol and artemisinin.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxide (NO), ambroxol, artemisinin.