

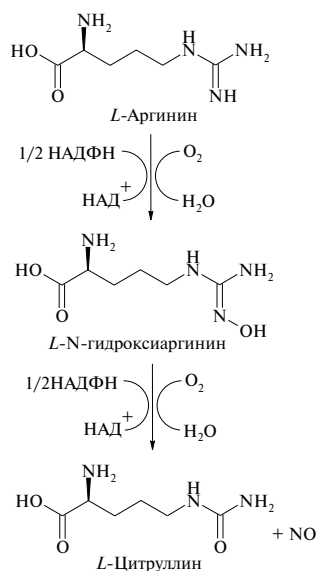
А. В. Данилов, В. А. Азимов, В. И. Левина, Н. В. Пятакова,  
И. С. Северина, Н. Б. Григорьев, В. Г. Граник

## НО-ДОНОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ГУАНОКСАН, ГУАНАБЕНЗ И МОКСОНИДИН

Государственный научный центр РФ по антибиотикам, Москва

В настоящее время в клинической практике используется ряд лекарственных средств, активность которых обоснованно связывают с их способностью высвобождать оксид азота в организме. Эти препараты являются пролекарствами (prodrugs), поскольку их фармакологическая активность обусловлена предшествующим метаболизмом с выделением оксида азота — истинного действующего начала. К таким препаратам, например, относятся такие известные периферические вазодилататоры, как нитроглицерин, изосорбид мононитрат, нитросорбид, эринит, амилнитрит, а также натрия нитропруссид и молсидомин [1].

Известно, что образование эндогенного оксида азота в организме животных и человека происходит в результате трансформации гуанидинового фрагмента *L*-аргинина под действием ферментов NO-синтаз [2] по схеме:

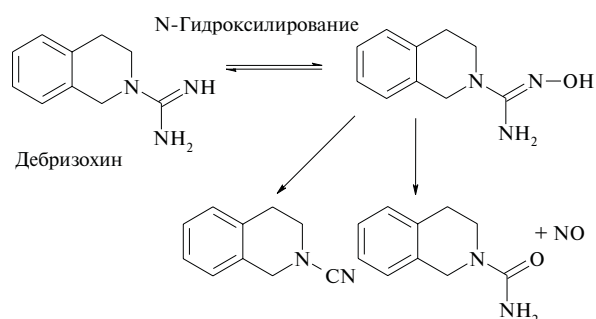


С другой стороны, в работах [3, 4] было показано, что окисление замещенных N-гидроксигуанидинов, в том числе N-гидроксиаргинина, приводящее к оксиду азота, возможно не только при катализе NO-синтазами, но и при участии цитохрома P-450, выделенного из гомогенатов печени животных. Интересно, что антигипертензивное действие производных N-гидроксигуанидинов было описано в 1973 году [5], то есть еще до установления определяющей роли оксида азота в регуляции тонуса кровеносных сосудов.

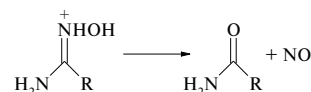
В работе [6] по исследованию способности “нефизиологических гуанидинов” генерировать при окислении оксид азота был выбран дебризохин — 3,4-дигид-

ро-2(1H)-изохинолин-карбоксимидамид, проявляющий, согласно [7], антигипертензивные свойства.

Установлено, что микросомальная инкубация этого соединения приводит не только к соответствующей мочеvine, как это характерно для NO-синтазного окисления *L*-аргинина до *L*-цитруллина, но и к N-цианпроизводному. Показано, что при микросомальном окислении N-гидроксигуанидинов образуются N-цианамиды. Общая схема окисления дебризохина может быть представлена следующим образом:



Для экзогенных соединений, содержащих амидиновые фрагменты, характерно окисление цитохромом P-450 или флавиносодержащей монооксигеназой, однако возможен и обратный процесс — восстановление промежуточных N-гидроксисоединений редуктазами [4]:



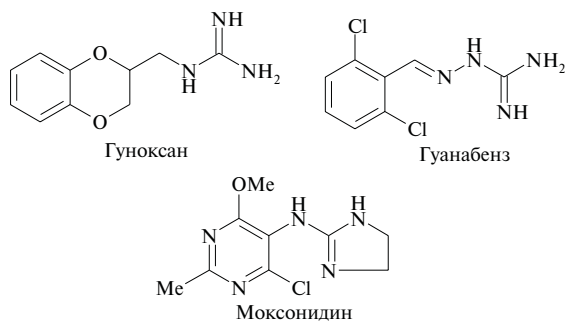
Важный вывод, который вытекает из исследований [4 – 7]: экзогенные производные гуанидина и родственные им соединения можно рассматривать как потенциальные доноры оксида азота.

В работе [8] были изучены NO-донорные свойства известных антигипертензивных препаратов гуанфацина и клонидина (клофелина). Это препараты центрального действия, которые понижают артериальное давление за счет стимуляции  $\alpha_2$ -адренорецепторов сосудодвигательных центров, уменьшают поток симпатических импульсов из ЦНС. Стимуляция  $\alpha_2$ -адренорецепторов приводит к снижению тонуса симпатической нервной системы, уменьшению высвобождения норадреналина и увеличению выброса ацетилхолина [9].

Предпосылкой для проведения исследования NO-донорных свойств данных соединений служило наличие в их структурах гуанидинового фрагмента (незамкнутого в гуанфацине и циклического в клонидине), что, согласно [3, 4], должно приводить к генерации оксида азота при окислительной деградации этих препаратов. В работе [8] химическое окисление сочеталось

с последующим полярографическим детектированием образующегося оксида азота в виде активного электрохимически нитропруссид-иона [10]. Оказалось, что как гуанфацин, так и клонидин генерируют оксид азота при их химическом окислении пероксидом водорода, а также активируют растворимую гуанилатциклазу (РГЦ).

В данной работе мы продолжили исследования NO-донорной активности антигипертензивных препаратов, содержащих в своей структуре гуанидиновый или имидазолиновый фрагмент. В качестве объектов исследования были выбраны такие агонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов, как гуаноксан и гуанабенз, а также агонист имидазолиновых I<sub>1</sub>-рецепторов моксонидин:



### Экспериментальная часть

Химическое окисление исследованных веществ при их концентрации  $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-4}$  М проводили феррицианидом калия, пероксидом водорода и гипохлоритом натрия при концентрации окислителей  $1 \cdot 10^{-3}$  М в боратных и фосфатных буферных растворах с pH 8 – 11, а также в растворах KOH с концентрацией 0,01 – 0,1 М. Детектирование NO полярографическим методом в виде нитропруссид-иона осуществляли по методике, описанной в [10], а также фотометрически по реакции Грисса.

Влияние исследованных соединений на активность РГЦ изучали на образцах фермента, полученного из тромбоцитов человека согласно [11]. Суспензию отмывтых тромбоцитов в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 0,2 мМ дитиотрейтола, подвергали ультразвуковой обработке на ультразвуковом дезинтеграторе MSE-5 – 78 (Великобритания) в течение 20 с при

Таблица 1  
Выход нитропруссид-иона при окислении гуаноксана, гуанабена и моксонидина в различных окислительных системах

Окислитель и условия окисления	Максимальный выход, %		
	гуаноксан	гуанабенз	моксонидин
$K_3[Fe(CN)_6] \cdot 10^{-3}$ М, боратный буферный раствор, pH 10, 4 ч при 80 °С	1,0	1,0	–
0,1 М KOH 80 °С	следы	–	1,0
$H_2O_2$ 1 М, 0,1 М KOH, 5 ч при 80 °С	2,0	–	1,5
$NaOCl \cdot 10^{-3}$ М, 0,01 М KOH, 1 ч при 80 °С	4,0	2,5	2,0

2 °С, а затем центрифугировали 1 ч при 105000 g. Надосадочную жидкость использовали в качестве препарата РГЦ. Активность РГЦ определяли согласно [12]. Пробы (конечный объем 150 мкл, pH 7,6) содержали 50 мМ Tris-HCl-буфер, 1 мМ гуанозинтрифосфата (ГТФ), 4 мМ креатинфосфата, 20 мкг (120 – 160 ед.) креатинфосфокиназы, 10 мМ теофиллина, супернатант 105000 g (15 – 20 мкг по белку) и другие добавки при необходимости. Исследованные соединения использовали в диапазоне концентраций  $10^{-7} - 10^{-4}$  М.

Количество циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), образовавшегося в ходе ферментативной реакции (15 мин при 37° С), определяли иммуоферментным методом с использованием набора реактивов для количественного определения цГМФ фирмы АОЗТ “Биоиммуноген” (Россия).

Белок определяли по методу Бредфорда [13].

В работе использовали ГТФ-натриевую соль фирмы “Fluka” (Швейцария), остальные биохимические реактивы — фирмы “Sigma” (США). Гуанабенз, гуаноксан и моксонидин были синтезированы согласно [14 – 16].

### Результаты и их обсуждение

Как следует из табл. 1, все исследованные соединения способны генерировать оксид азота при химическом окислении аналогично тому, как это наблюдалось в случае гуанфацина и клонидина [8].

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что хотя все исследованные соединения способны генерировать оксид азота при химическом окислении, однако величина выхода NO сильно зависит от применяемой окислительной системы, и его максимальное значение достигается при окислении гипохлоритом натрия.

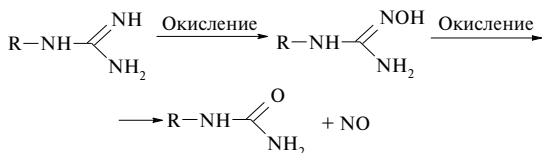
Необходимо отметить, что механизм процессов химического окисления исследованных соединений достаточно сложен, и потому к полученным количественным результатам по выходу NO, характеризующим эффективность прохождения реакции окисления именно в этом направлении, нужно подходить с достаточной осторожностью. Это связано с тем, что оптимальные условия окисления для соединений разного строения могут различаться. Однако способность исследованных соединений генерировать оксид азота в результате их окисления сомнений не вызывает. И в этой связи необходимо отметить работу [17], в которой было показано выделение оксида азота при окислении гуанабена цитохромом P-450, выделенным из микросом печени кроликов или крыс, что указывает на сход-

Таблица 2  
Активация РГЦ в присутствии гуаноксана (базальная активность  $62 \pm 8$  усл. ед.)

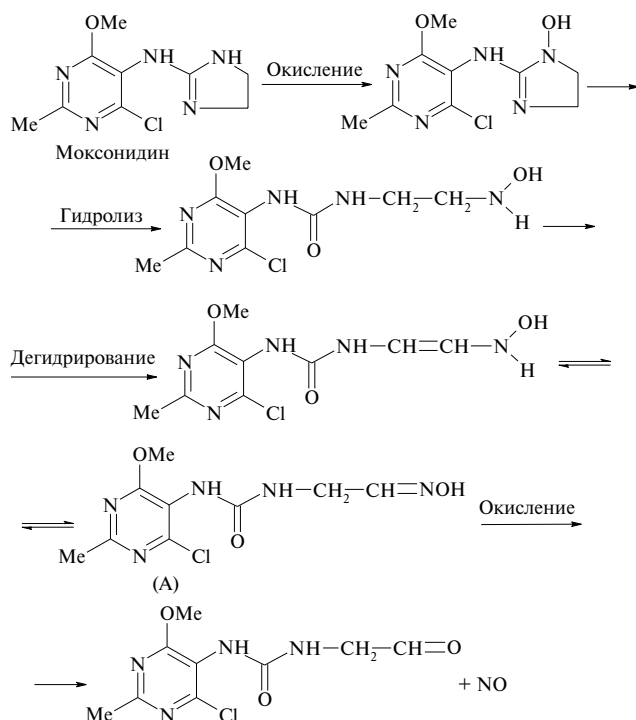
Концентрация гуанабена, М	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
Условная активность РГЦ	$99 \pm 8$	$298 \pm 25$	$391 \pm 29$
Коэффициент активации	1,6	4,8	6,3

ство в направлении прохождения химических и биохимических процессов окисления “нефизиологических” гуанидино-подобных соединений.

По аналогии с механизмом окисления гуанфацина, предложенным в [10], можно предположить, что процесс химического окисления гуаноксана и гуанабенза протекает, в целом, так же, как и окисление аргинина, и может быть описан следующей схемой:



Существенным отличием моксонидина является наличие циклической гуанидиновой (имидазолиновой) системы. В этом случае гипотетическая схема его окисления, по аналогии со схемой, предложенной для клофелина [10], может быть представлена в следующем виде:



Вероятно, лимитирующей скоростью реакции стадией процесса в целом является стадия дегидрирования, в результате которой после перегруппировки образуется оксим (A), который по известной схеме окисления оксимов [18] трансформируется в соответствующее карбонильное соединение и оксид азота.

Таблица 3  
Активация РГЦ в присутствии гуанабенза (базальная активность  $62 \pm 8$  усл. ед.)

Концентрация гуанабенза, М	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
Условная активность РГЦ	$57 \pm 4$	$205 \pm 19$	$180 \pm 11$
Коэффициент активации	0,92	3,3	2,9

Известно, что наиболее важной физиологической мишенью действия оксида азота в организме является упомянутый выше фермент РГЦ, локализованная в гладких мышцах кровеносных сосудов и ответственная за их релаксацию. Активация данного фермента по NO-гем-зависимому механизму приводит к резкому ускорению процесса ГТФ  $\rightarrow$  цГМФ. Образующийся циклический мононуклеотид в свою очередь активирует цГМФ-зависимые протеинкиназы, что приводит к дефосфорилированию цепей миозина в гладких мышцах кровеносных сосудов, приводя к их релаксации и в результате — к снижению кровяного давления.

Вполне естественно было предположить, что исследованные соединения, являющиеся донорами оксида азота, должны активировать РГЦ. Как следует из результатов, приведенных в табл. 2 – 4, гуаноксан, гуанабенз и моксонидин вызывают зависимую от концентрации препаратов активацию РГЦ.

Как следует из приведенных в табл. 2 – 4 данных, в целом гуаноксан и гуанабенз значительно сильнее активируют РГЦ по сравнению с аналогичным препаратом гуанфацином, также содержащим в структуре молекулы гуанидиновый фрагмент. Так, максимальный коэффициент активации РГЦ для гуанфацина составляет 1,8 [10], в то время как в случае гуаноксана и гуанабенза эти значения составляют 6,6 и 3,3 соответственно. Сравнимо с клонидином (содержащим имидазолиновое кольцо) максимальное значение коэффициента активации у моксонидина — 1,7 и 1,8 соответственно.

Особо следует отметить чрезвычайно сильную активацию РГЦ гуаноксаном, что однозначно свидетельствует о вкладе цГМФ-зависимого механизма релаксации периферических кровеносных сосудов в общее антигипертензивное действие данного препарата.

И в заключение, уже указывалось, что целый ряд лекарственных средств, открытых и введенных в медицинскую практику еще до “эпохи NO” являются донорами оксида азота (и, соответственно, пролекарствами). В последние годы мы показали, что среди лекарственных препаратов, активно используемых в здравоохранении, весьма большую роль играют доноры оксида азота [1]. Это известные антибактериальные препараты нитрофуранового ряда — фурацилин, фурагин и др., производные сиднонимина — сиднокарб, сиднофен; антипротозойные препараты — метронидазол, нитазол и тинидазол; антигипертензивные средства — клонидин, гуанфацин и, как показано в на-

Таблица 4  
Активация РГЦ в присутствии моксонидина (базальная активность  $89 \pm 10$  усл. ед.)

Концентрация моксонидина, М	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Условная активность РГЦ	$98 \pm 6$	$160 \pm 11$	$89 \pm 7$
Коэффициент активации	1,1	1,8	1,0

стоящей работе, гуаноксан, гуанабенз и моксонидин. В связи с этим возникает серьезная проблема, настоятельно требующая решения, — в какой степени генерация оксида азота оказывает влияние на механизм действия и эффективность указанных лекарственных средств?

Очевидно, что полученные результаты по NO-донорным свойствам рассматриваемых препаратов и активации ими РГЦ заслуживают внимания при обсуждении механизма их фармакологического действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Грант № 030406875.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Известия РАН, Сер. Хим.*, № 8, 1268 – 1313 (2002).
2. M. A. Marletta, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12231 – 12234 (1993).
3. D. Mansug, J. L. Boucher, and B. Clement, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **187**, 880 – 886 (1992).
4. B. Clement, J. L. Boucher, D. Mansuy, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 439 – 445 (1999).
5. D. M. Bailey, C. G. De Grazia, H. E. Lape, et al., *J. Med. Chem.*, **16**, 151 – 156 (1973).
6. B. Clement, M. H. Schulze-Mosgau, H. Wohlers, *Biochem. Pharmacol.*, **46**(12), 2249 – 2267 (1993).
7. A. Mahgoub, L. G. Gring, I. R. Idle, et al., *Lancet*, **8038**, 584 – 586 (1977).
8. В. И. Левина, Н. В. Пятакова, О. Г. Бусыгина и др., *Химия гетероцикл. соед.*, № 12, 1665 – 1671 (2002).
9. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1, Медицина, Москва (1993).
10. В. И. Левина, А. В. Данилов, Н. Б. Григорьев, *Хим.-фарм. журн.*, **32**(4) 53 – 58 (1998).
11. Ю. Ю. Чирков, И. А. Тыщук, Н. Н. Белушкина и др., *Биохимия*, **52**, 956 – 963 (1987).
12. D. L. Garbers and F. Murad, *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57 – 64 (1979).
13. M. M. Bradford, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248 – 254 (1976).
14. J. Yates and E. Haddock, Патент Великобритании 1019120 (1966); *Chem. Abstr.*, **64**, 11132h (1966).
15. J. Augstain, A. M. Monro, G. W. H. Potter, and P. Sholfield, *J. Med. Chem.*, **11**(4), 844 – 848, (1968).
16. W. Stenzel, Ger Offen 3016767 (1981); *Chem. Abstr.*, **96**, 52327 (1982).
17. B. Clement and M Demesmaeker, and S. Linue, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 682 – 688 (1996).
18. L. N. Koikov, N. V. Alexeeva, E. A. Lisitza, et al., *Mendeleev Commun.*, 165 – 167 (1998).

Поступила 17.07.08