

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2014

Л. В. Татьяненко, О. В. Доброхотова, В. Н. Варфоломеев, М. А. Фадеев,
Б. С. Фёдоров, В. Н. Штолько, Д. В. Мищенко

ВЛИЯНИЕ МЕКСИДОЛА И НИТРОКСИМЕКСИДОЛА НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ, НЕКОТОРЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ГИПОКСИИ

Институт проблем химической физики РАН, Московская область, Черноголовка, Россия,
e-mail: mdv@icp.ac.ru

Исследовано влияние мексидола (М) и нитроксимексидола (НМ) на активность фосфодиэстеразы циклического гуаназилмонофосфата (ФДЭцГМФ), регуляцию процессов перекисного окисления липидов, антирадикальной защиты и антиоксидантной активности в условиях нормоксии и гиперкапнической нормобарической гипоксии. Выявлен обратимый и неконкурентный характер ингибирования М и НМ гидролитической функции ФДЭцГМФ. K_i мексидола составляет $1 \cdot 10^{-4}$ М, а K_i нитроксимексидола — $1 \cdot 10^{-5}$ М, то есть НМ на порядок активнее лекарственного препарата М. Показано, что увеличение времени жизни животных в замкнутом пространстве на фоне действия М составляет 36 % по сравнению с контролем, в то время как для НМ этот показатель равен 53 %. Время сокращения желудочков сердца увеличивается, в случае НМ этот показатель равен 137 %. Время сокращения предсердия увеличивается с 31 мин в контроле до 52 и 57 мин для М и НМ соответственно.

Ключевые слова: фосфодиэстераза цГМФ; перекисное окисление липидов (ПОЛ); гипоксия; антиоксиданты.

В последние годы в ИПХФ РАН активно развивается направление, связанное с синтезом новых высокоэффективных и нетоксичных препаратов, способных генерировать NO в условиях биотрансформации [1, 2].

Широко известно применение мексидола в медицинской практике в качестве ингибитора перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3, 4].

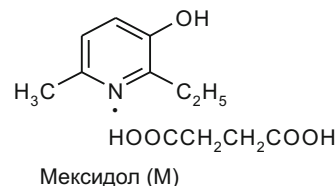
В ИПХФ РАН синтезировано новое нетоксичное производное мексидола нитроксимексидол [5].

Целью нашего исследования явилось изучение роли мексидола и нитроксимексидола в регуляции процессов ПОЛ, антирадикальной защиты, модуляции активности фосфодиэстеразы цГМФ, а также антигипоксической активности в условиях нормоксии и гиперкапнической нормобарической гипоксии.

Экспериментальная часть

В работе использовали циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), нуклеотидазу (в виде яда кобры), гистидин, трис-НСI фирмы “Sigma” без дополнительной очистки, а также трихлоруксусную кислоту, молибдат аммония (марки фирмы “Реахим”, Россия) после соответствующей дополнительной очистки, Мексидол (М) синтезирован по методу [6]. Нитроксимексидол (НМ) синтезирован по методу [5], его нитрогруппа присоединена к молекуле янтарной кислоты, степень чистоты составляет 98% по методу газо-жидкостной хроматографии.

Фермент фосфодиэстераза (ФДЭ) цГМФ выделяли из коры головного мозга самцов крыс линии “Вистар” [7]. Ткань головного мозга крыс гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлаждённого 0,2 М трис-НСI буфера, pH 7,5. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40000 г на центрифуге К-32М. Супернатант, содержащий фермент, замораживали в жидком азоте.



Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [8]. Активность ФДЭ цГМФ в присутствии и в отсутствие химических соединений (мексидола и нитроксимексидола) определяли по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, которое равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении нуклеотидазы [6]. Общая схема реакции:

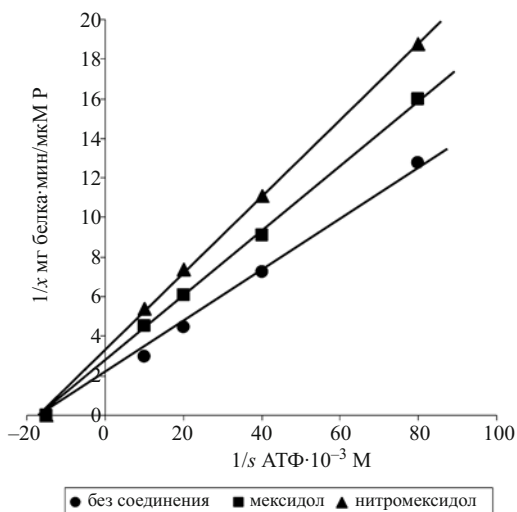


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза цГМФ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка

ФДЭ цГМФ + цГМФ → нуклеотидаза → ГМФ + P_n.

К 1 мл 0,2 М трис буфера (рН = 7,6) добавляли раствор ФДЭ цГМФ, содержащий 1 мг белка. Исследуемые препараты в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ добавляли к ферменту. Через 30 мин преинкубации при комнатной температуре добавляли субстрат — 0,1 мМ цГМФ.

Пробы выдерживали в термостате при 30 °С в течение 20 мин. Дополнительно пробы инкубировали на водяной бане при кипении воды в течение 3 – 5 мин. Затем в охлаждённые до комнатной температуры пробы добавляли 50 мкг яда кобры и выдерживали при 30 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0,2 мл 55 % трихлоруксусной кислоты. Реакционную смесь центрифугировали при 4500 об/мин в течение 15 мин. Активность ФДЭ цГМФ в присутствии (опыт) и в отсутствие (контроль) исследуемых химических соединений (ХС) определяли по количеству неорганического фосфата, накапливающегося в процессе ферментативной реакции спектроскопическим методом при длине волны λ = 735 нм. При определении активности ФДЭ цГМФ использовали спектрофотометр “Specord M-40” (“Карл Цейс”).

Относительную активность фермента рассчитывали по формуле

$$I = 100 \cdot (A_0 - A) / A_0,$$

Таблица 1
Процент ингибирования функции ФДЭ цГМФ мексидолом и нитромексидолом

Препарат	Концентрация		
	100 мкМ	10 мкМ	1,0 мкМ
Мексидол	52 ± 8	30 ± 5	16 ± 2
Нитромексидол	85 ± 8*	53 ± 6*	35 ± 4*

* p ≤ 0,01 по сравнению с М.

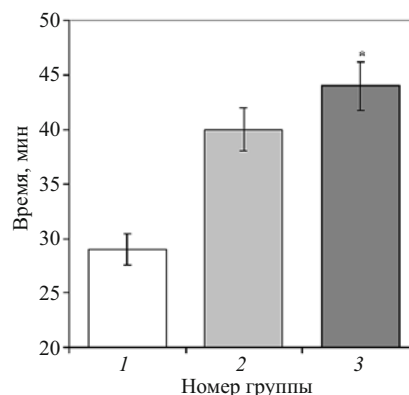


Рис. 2. Время наступления агональных явлений у мышей, помещенных в закрытое герметическое пространство в группе контрольных животных (1) и после предварительного введения мексидола (2) и нитромексидола (3). Приведены средние значения 5 независимых экспериментов. (*) p ≤ 0,05 по сравнению с М.

где I — относительная активность; A₀ — удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе (без комплекса); A — удельное содержание неорганического фосфора в опытной пробе (в присутствии комплекса).

Обратимость действия ХС определяли путём диализа проб, содержащих фермент, в отсутствие и в присутствии 100 мкМ ХС в пробах. Диализ проводился против 100-кратного избытка среды инкубации, не содержащей исследуемых ХС, в течение 24 ч при 4 – 5 °С.

Характер ингибирования ФДЭ цГМФ определяли по методу [9]. Исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (цГМФ) в отсутствие и в присутствии исследуемых ХС в концентрации 100 мкМ. Зависимость ферментативной реакции ФДЭ цГМФ от концентрации субстрата выражали в координатах Лайнуивера-Берка.

Спонтанное ПОЛ гомогената головного мозга самцов мышей линии С₅₇В1 массой 22 – 24 г проводили в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 7,4, концентрация белка 1 мг/мл, температура 36 °С в течение 30 мин в присутствии (опыт) или в отсутствие (контроль) исследуемых веществ [10]. Интенсивность ПОЛ определяли по образованию диеновых конъюгатов [11], а антирадикальную активность — методом хемилюминесценции [12].

Гипоксию с гиперкапнией исследовали на 30 мышях-самцах массой 18 – 20 г. Животных помещали в

Таблица 2
Выявление обратимости действия мексидола и нитромексидола на гидролитическую функцию ФДЭ цГМФ

Соединение	Нормированные значения скорости гидролиза цГМФ, %	
	до диализа	после диализа
Контроль	100	100
Мексидол	48 ± 8	100*
Нитромексидол	15 ± 2	100*

* p ≤ 0,01 по сравнению с контролем до диализа.

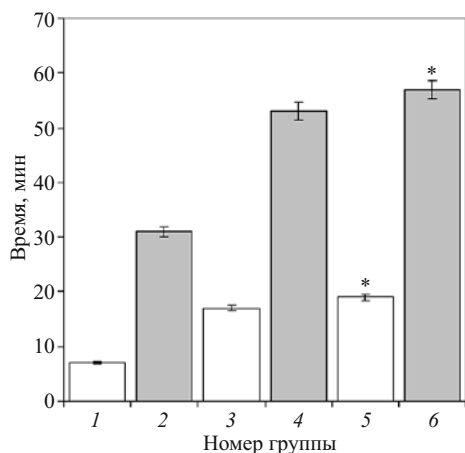


Рис. 3. Продолжительность сохранения сократительной активности желудочков сердца (1, 3, 5) и ушка предсердия (2, 4, 6) в контроле (1, 2) и при предварительном введении мексидола (3, 4) и нитроксимексидола (5, 6). Приведены средние значения 5 независимых экспериментов. (*) $p \leq 0,05$ по сравнению с М.

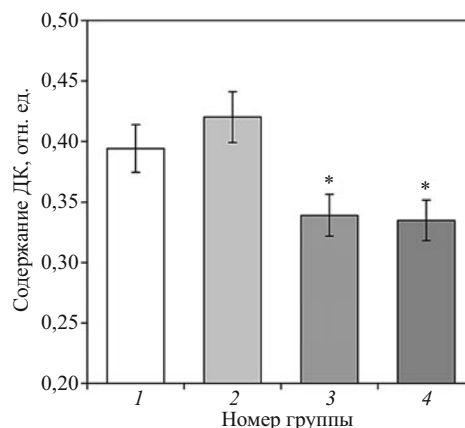


Рис. 4. Влияние мексидола (3) и нитроксимексидола (4) на накопление диеновых конъюгатов в липидах гомогенатов ткани печени кролика в контроле (1) и при спонтанном окислении (30 мин, 37 °С) в атмосфере воздуха (2, 3, 4). Приведены средние значения 5 независимых экспериментов. (*) $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

стеклянные банки объемом 250 мл с герметичными крышками, которые опускали под воду во избежание подсоса воздуха. М и НМ вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг за 30 мин до гипоксии. Регистрировали время наступления агональных явлений.

Исследование гипоксии сердца проводили на модели “открытое сердце”. После забоя животных дислокацией шейных позвонков вскрывали грудную клетку, освобождая сердце, и фиксировали продолжительность сохранения сократительной работы желудочков и ушка предсердия в контроле и при введении М и НМ. Во избежание высыхания миокарда сердце периодически смачивали физиологическим раствором из пипетки. Исследуемые соединения вводили за 30 мин до декапитации внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг.

Результаты и их обсуждение

Было проведено сравнительное исследование влияния мексидола и нитроксимексидола на активность ФДЭ цГМФ. Известно, что ингибирование ФДЭ цГМФ способствует накоплению цГМФ — вторичного мессенжера, принимающего участие в регуляции тонуса сосудов и агрегации тромбоцитов [13 – 15].

Как видно из табл. 1, М и НМ являются ингибиторами функции ФДЭ цГМФ.

НМ является наиболее выраженным ингибитором функции фермента: в 10 мкМ концентрации он тормозит расщепление цГМФ на $85 \pm 9 \%$, а в 1,0 мкМ концентрации — на $53 \pm 6 \%$, что значительно больше ин-

гибирующего эффекта мексидола — $42 \pm 8 \%$ и $30 \pm 5 \%$ соответственно. Концентрационные различия действия М и НМ на гидролиз цГМФ указывают на различную степень их взаимодействия с ферментом.

Для изучения характера действия М и НМ на гидролиз цГМФ были исследованы зависимости скорости гидролиза цГМФ в присутствии и в отсутствие исследуемых соединений от концентрации субстрата (от 0,1 до 0,01 мМ).

Полученные данные представлены в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 1). Показано, что K_m цГМФ для ФДЭ цГМФ составляет $8 \cdot 10^{-5}$ М. Выявлен неконкурентный характер ингибирования М и НМ гидролитической функции ФДЭ цГМФ. K_i мексидола составляет $1 \cdot 10^{-4}$ М, а K_i нитроксимексидола — $1 \cdot 10^{-5}$ М. Следовательно, НМ на порядок активнее М.

Полученные данные указывают на отсутствие непосредственного взаимодействия М и НМ с активным центром фермента.

Как видно из табл. 2, М и НМ являются обратимыми ингибиторами функции ФДЭ цГМФ. Активность фермента полностью восстанавливается после диализа раствора фермента, содержащего М и НМ в 0,1 мМ концентрации, против 200 мл трис-НСl буфера в течение 24 ч при 4 – 5 °С в отсутствие исследуемых соединений. Это показывает, что М и НМ связываются с ферментом нековалентно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о преимущественном ингибировании процесса гидролиза субстрата ФДЭ цГМФ вновь синтезированным препаратом по сравнению с М.

Данные сравнительного исследования антигипоксического действия НМ и М на 2 экспериментальных моделях представлены на рис. 2 и 3.

Полученные данные (рис. 2) свидетельствуют о том, что увеличение времени жизни животных в замкнутом пространстве на фоне действия М составляет 36 % по сравнению с контролем, в то время как для НМ этот показатель составляет 53 %.

Таблица 3
Процент тушения хемилюминесценции люминола мексидолом и нитроксимексидолом

Соединение	Концентрация		
	10^{-6} М	10^{-5} М	10^{-4} М
Мексидол	$12,1 \pm 1,3$	$35,2 \pm 2,8$	$77,2 \pm 5,1$
Нитроксимексидол	$29,3 \pm 2,5^*$	$54,5 \pm 4,3^*$	$90,5 \pm 6,1^*$

* $p \leq 0,01$ по сравнению с М.

Данные о продолжительности сохранения сократительной активности различных отделов сердца (рис. 3) свидетельствуют о том, что время сокращения желудочков сердца увеличивается в случае применения М на 122 %, а в случае введения НМ этот показатель равен 137 %. Время сокращения ушек предсердия увеличивается с 31 мин в контроле до 52 и 57 мин для М и НМ соответственно.

Таким образом, данные сравнительного изучения М и НМ свидетельствуют о более выраженном антигипоксическом эффекте НМ по сравнению с М. Показано, что НМ вызывает сходные гемодинамические эффекты с другими донорами NO*, т.е. снижают потребность миокарда в кислороде за счет снижения напряжения стенок желудочков, понижают артериальное давление и объемы желудочков, а также благодаря улучшению снабжения миокарда кислородом, за счет снижения кровотока и коронарного сопротивления, спазма коронарных артерий и уменьшения коронарного кровотока. Полученные эффекты позволяют нам сделать предположение, что НМ является донором монооксида азота.

Возникновение и развитие различных патологических состояний связано с нарушением равновесия в системах ПОЛ — антиоксидантная защита организма, что требует соответствующей коррекции с применением экзогенных антиоксидантов [16, 17].

Непосредственная оценка интенсивности ПОЛ осуществлялась путем определения содержания первичных продуктов окисления диеновых конъюгатов [11]. Полученные данные приведены на рис. 4. Из рисунка видно, что М и НМ уменьшают содержание диеновых конъюгатов на 19 и 22 % соответственно (различия статистически недостоверно). Антирадикальная активность М и НМ, измеренная методом хемилюминесценции [12], значительно различаются (табл. 3). При этом 50 % ингибирование хемилюминесценции наблюдается при концентрации М $4,3 \cdot 10^{-5}$ М, в то время как для НМ эта величина равна $7,3 \cdot 10^{-6}$ М.

Данные сравнительного изучения М и НМ свидетельствуют о более выраженном антигипоксическом и

антирадикальном эффекте НМ по сравнению с М. Полученные данные позволяют рекомендовать НМ для дальнейшего изучения в качестве потенциального лекарственного препарата при лечении инфарктов, инсультов и других сосудистых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. T. N. Roudneva, N. Sanina, D. Mischenko, et al., *Nitric Oxide-biol. Chem.*, **19**, 43 – 43 (2008).
2. L. V. Tat'yanenko, O. V. Dobrokhotova, R. A. Kotel'nikova, et al., *Pharm. Chem. J.*, **45**(6), 329 – 332 (2011).
3. Л. М. Байдер, О. Л. Белая, З. В. Куроптева и др., *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 3, 44 – 47 (2009).
4. Р. Г. Глушков, С. Д. Южаков, М. В. Алексеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **45**(3), 3 – 8 (2011); *Pharm. Chtm. J.*, **45**(3), 131 – 136 (2011).
5. Б. С. Федоров, В. Н. Варфоломеев, М. А. Фадеев и др., Патент РФ № 2394815 “Нитроксисукцинат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (варианты использования) и способ его получения” (2010).
6. В. К. Промоненков, В. П. Рутковский, Патент РФ 2211833.
7. Р. Е. Либерзон, Т. Т. Щеколдина, О. С. Ватолкина, *Вопросы мед. химии*, **4**, 526 – 530 (1977).
8. Д. Бейли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1982), сс. 53 – 60.
9. И. Б. Березин, А. А. Хлесов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, Издательство МГУ, Москва (1976), сс. 77 – 84.
10. R. A. Kotel'nikova, D. V. Mishchenko, D. A. Zhokhova, et al., *High Energy Chem.*, **43**(7), 582 – 586 (2010).
11. T. E. Slater, *Methods Enzymology.*, Academic Press, N. Y. (1984).
12. Р. Ф. Котельникова, И. И. Файнгольд, *Известия АН, Сер. хим.*, **6**, 1146 – 1150 (2011).
13. F. Rind, *Modern Drug Discoveri*, Nov / Dec, 31 (1998).
14. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Изв. АН. Сер. хим.*, **8**, 1268 – 1272 (2002).
15. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вузовская книга, Москва (2004), с. 360.
16. R. A. Kotel'nikova, I. I. Faingołd, D. A. Poletaeva, et al., *Rus. Chem. Bul.*, **60**(6), 1172 – 1176 (2011).
17. А. И. Котельников, Г. Н. Богданов, Д. В. Мищенко и др. *Альманах клин. мед.*, **1**(17), 199 – 200 (2008).

Поступила 10.10.12

EFFECT OF MEXIDOL AND NITROXYMEXIDOL ON THE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY, SOME OXIDATION PROCESSES, AND ANTIHYPOXIC RESISTANCE

L. V. Tat'yanenko, O. V. Dobrokhotova, V. N. Varfolomeev, M. A. Fadeev, B. S. Fedorov, V. N. Shtol'ko, and D. V. Mishchenko*

Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia;
* e-mail: mdv@icp.ac.ru

The effect of mexidol (M) and nitromexidol (NM) on the activity of phosphodiesterase of cyclic guanosine monophosphate (PDEcGMP), regulation of lipid peroxidation (LPO), and the antiradical and antihypoxic activity has been investigated under conditions of normoxia and normobaric hypercapnic hypoxia. The reversible and noncompetitive character of inhibition of the hydrolytic function of PDEcGMP by M and NM has been revealed. The value of K_i is $1 \cdot 10^{-4}$ M for M and $1 \cdot 10^{-5}$ M for NM, i.e. NM is 10 times more active than M. It is shown that the lifetime of experimental animals in closed space increases by 36% under the action of M as compared to that in the control group of animals, while this parameter for NM is 53%. Ventricular contraction time increases by 122% for M and by 137% for NM. Auricle contraction time increases from 31 minutes for the control group to 52 and 57 minutes for M and NM, respectively. The antiradical activity measured using luminol luminescence quenching was found to be 2.4 times higher for NM than for M at a concentration of 10^{-6} M and 1.5 times higher at a concentration of 10^{-6} M.

Keywords: cGMP phosphodiesterase, lipid peroxidation, hypoxia, antioxidants