

УДК 662.232.9+54.04+54.062

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ 2-НИТРОКСИСУКЦИНАТ 3-ОКСИ-6-МЕТИЛ-2-ЭТИЛПИРИДИНА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ NO-ГЕНЕРИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ

О. В. Покидова^{1,*}, Е. В. Батова², А. П. Садков¹, А. Б. Еремеев¹,
Б.С. Федоров¹, А. И. Котельников^{1,3}

Представлено академиком РАН С.М. Алдошиным 14.01.2019 г.

Поступило 13.02.2019 г.

Изучена способность соединения 2-нитроксисукцинат 3-окси-6-метил-2-этилпиридин (I) генерировать нитрит-ионы (NO_2^-) и монооксид азота (NO) в модельных системах с цистеином (Cys) и дезоксигемоглобином (Hb). Установлено, что из соединения I происходит более эффективное выделение NO_2^- и NO, чем из Никорандила. Скорость накопления NO_2^- в системе Cys с I в 1,5 раза выше, чем с нитроглицерином. Показано, что, в отличие от Нитроглицерина, соединение I не восстанавливается Hb.

Ключевые слова: реакция Грисса, дезоксигемоглобин, доноры оксида азота, органические нитраты.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864437-440>

В настоящее время важной задачей здравоохранения является снижение заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных в основном ишемической болезнью сердца (ИБС). Медикаментозное лечение ИБС заключается в комплексном приёме препаратов, проявляющих сосудорасширяющее, мочегонное и разжижающее кровь действия. Используемые в медицинской практике органические нитраты, такие как, например, Нитроглицерин, Никорандил, Изосорбид динитрат, являются хорошими вазодилатирующими агентами, за счёт чего широко используются в терапии ИБС. Установлено, что биологический эффект органических нитратов связан с генерацией монооксида азота NO, при этом в процесс их восстановления до NO вовлечён целый ряд субстратов, в том числе тиолы, аскорбат, альдегиддегидрогеназа и т.д. [1, 2]. Образующиеся молекулы NO активируют гуанилатциклазу, что в конечном счёте через каскад внутриклеточных реакций приводит к сосудорасширяющему эффекту [3].

Синтезированное в Институте проблем химической физики оригинальное полифункциональное соединение 2-нитроксисукцинат 3-окси-6-метил-2-этилпиридина (I), рис. 1 [4], сочетает в себе свойства органического нитрата с эффективным антиоксидантным действием [5] и является перспективным препаратом для комплексного лечения ИБС. Данное соединение также проявило себя как хороший ингибитор фосфодиэстеразы [6] — фермента, являющегося наравне с гуанилатциклазой ключевым компонентом регулирования уровня циклических нуклеотидов. Таким образом, влияние I одновременно на две эти важнейшие ферментативные системы позволяет прогнозировать его высокую кардиопротекторную и антиишемическую активность.

В данной работе оценена активность I как донора NO. В качестве восстановителя выбран цистеин (Cys), механизм реакции которого с органическими нитратами изучен [7]: на первой стадии образуются тионитраты, из которых в результате трансформации выделяются как нитрит-ионы (NO_2^-), так и NO. Имеются данные [8], что скорость образования NO_2^- из органических нитратов в реакции с Cys коррелирует с их сосудорасширяющим действием. Таким образом, по скорости образования NO_2^- в системе органический нитрат — Cys можно судить об их эффек-

¹Институт проблем химической физики
Российской Академии наук, Черноголовка Московской обл.

²Ивановский государственный университет

³Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

*E-mail: pov@icp.ac.ru, olesia16@mail.ru

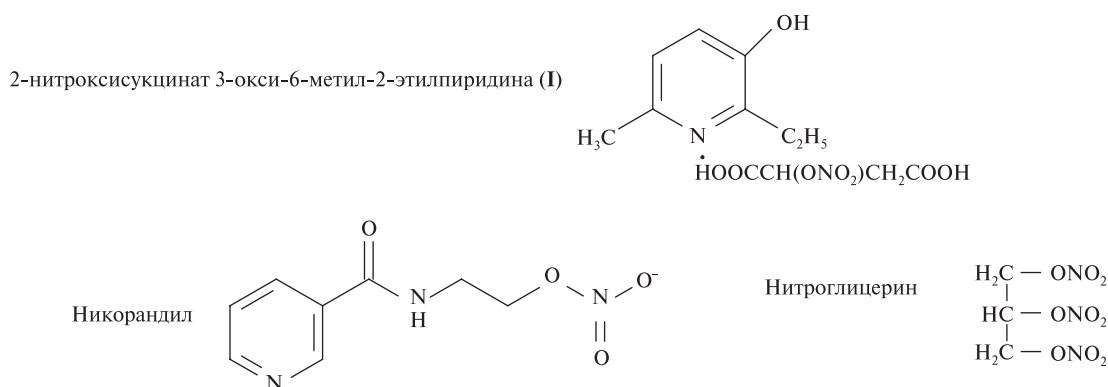


Рис. 1. Структуры органических нитратов.

тивности в качестве вазодилаторных препаратов. Активность I в работе сравнивалась с активностью препаратов, используемых в клинической практике: Нитроглицерина и Никорандила (рис. 1).

Наиболее удобным и широко используемым методом для определения количественного содержания NO_2^- является реакция Грисса [9]. Метод основан на определении оптической плотности (пропорциональной концентрации NO_2^-) анилинового азокрасителя, образующегося в ходе реакции NO_2^- с сульфаниламидом (SA) и N-(1-нафтил)этилендиамином (NEDA).

На рис. 2 приведены кинетические зависимости накопления NO_2^- для I и Нитроглицерина. Реакцию начинали введением органических нитратов к Cys и проводили при 23 °С при перемешивании в течение 5 ч в анаэробных условиях. Конечная концентрация Cys в реакционной смеси была 10^{-3} М, органических нитратов — $9 \cdot 10^{-4}$ М. Через определённые интервалы времени отбирали алиquotы реакционной смеси по 0,5 мл и вводили в сосуды, содержащие 1,5 мл 0,5%-ного раствора SA (“Sigma”, США) в 0,25 М HCl. Инкубировали 5 мин при комнатной температуре и прибавляли 1 мл 0,02%-ного раствора NEDA (“MP Biomedicals”, Германия) в 0,5 М HCl. Через 10 мин определяли величину оптической плотности при 540 нм на спектрофотометре Specord M-40. Концентрацию NO_2^- рассчитывали по калибровочной кривой, которую строили по нитриту натрия.

Установлено, что при взаимодействии I с Cys идёт эффективное выделение NO_2^- : за 5 ч образуется $27,21 \pm 4$ мкМ NO_2^- (рис. 2).

В опытах с Нитроглицерином за 5 ч образовалось $15,12 \pm 3$ мкМ NO_2^- (рис. 2). Следовательно, активность I более чем в 1,5 раза превосходит активность Нитроглицерина.

В отличие от системы Cys—I, в модельной системе Cys—Никорандил за 5 ч количество образующегося NO_2^- значительно меньше, в пределах погрешности эксперимента. Спустя 19 ч от начала реакции в данной системе образуется 0,75 мкМ NO_2^- . Таким образом, активность Никорандила значительно ниже, чем активности Нитроглицерина и соединения I.

Значительную роль в процессе превращения NO в NO_2^- играет дезоксигемоглобин Hb, который является одним из основных источников восстановления NO_2^- [10]. Следует отметить, что Hb способен вступать в окислительно-восстановительные реакции с некоторыми органическими нитратами. Так, известно, что Нитроглицерин реагирует с Hb с образованием NO_2^- и метгемоглобина [11]. По этой причине при внутривенном введении препарата Нитроглицерина имеется риск развития метгемоглобинемии.

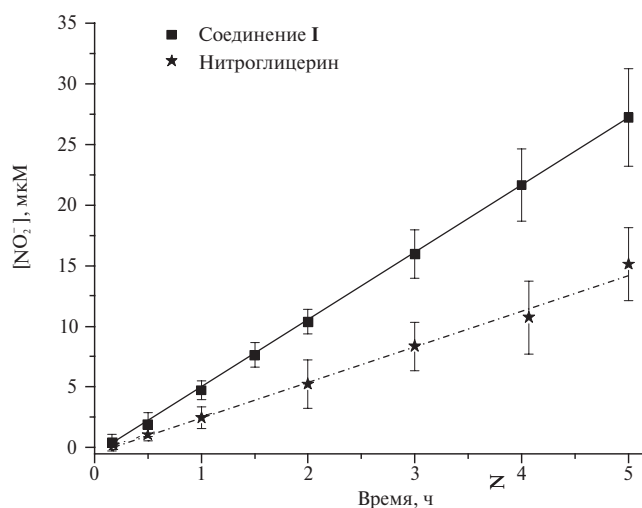


Рис. 2. Кинетика реакции накопления NO_2^- в системе $9 \cdot 10^{-4}$ М I или Нитроглицерин с 10^{-3} М Cys. Точки — экспериментальные данные. Растворитель 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,0; температура 23 °С.

На следующем этапе работы была изучена NO-донорная активность органических нитратов в модельной системе Cys-органический нитрат — Hb. Данную систему удобно использовать для спектрофотометрической регистрации кинетики накопления NO по скорости образования нитрозилированного гемоглобина (HbNO), так как Hb является ловушкой для NO: скорость связывания NO с гемами Hb близка к диффузионной, константа связывания равна $3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ [12]. Кроме того, HbNO имеет характерный спектр поглощения: максимум поглощения Hb (556 нм) при образовании HbNO будет расщепляться на два (545 и 575 нм), что удобно для определения глубины протекания реакции.

Гомогенный раствор гемоглобина выделяли из свежей крови экспериментальных животных по известной методике [13]. Полученный препарат представлял собой раствор оксигемоглобина в воде с концентрацией $4,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Для его перевода в Hb раствор препарата продували в сосудах объёмом 10 мл в токе аргона в течение 10 мин.

Все дальнейшие опыты с органическими нитратами, Cys и Hb проводили в атмосфере аргона при 23 °С. Прежде всего было установлено, что Hb в отсутствие Cys не восстанавливает I и Никорандил: спектр Hb в реакционной системе Hb — органический нитрат не изменялся во времени. Далее был поставлен опыт в присутствии Cys. Для этого в кварцевую кювету, содержащую 1,47 мл раствора Hb, прибавляли аликвоту анаэробного раствора Cys. Реакцию начинали введением органических нитратов в кювету, спектры поглощения регистрировали через определённые интервалы времени в течение 24 ч. Конечная концентрация органических нитратов $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, Cys — $7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, Hb — $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Кювета сравнения содержала 3 мл фосфатного буфера pH 7,0. Разложение спектров поглощения реакционной системы на составляющие компоненты (Hb и HbNO) для определения концентрации компонентов реакции проводили с помощью программы MathCAD.

При исследовании соединения I в тройной системе Cys-органический нитрат — Hb установлено, что идет эффективное выделение NO с последующим образованием HbNO. На рис. 3 представлены спектры поглощения данной системы. Видно, что в области максимума поглощения Hb (556 нм) происходит постепенное уменьшение оптической плотности, а в области 545 и 575 нм — её нарастание, которое свидетельствует об образовании HbNO.

Для Никорандила процесс происходит значительно медленнее, два выраженных пика HbNO за сутки не образуются.

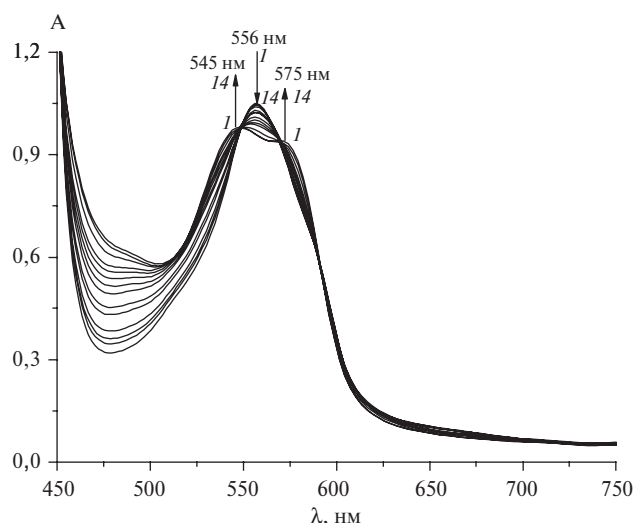


Рис. 3. Изменение спектров поглощения во времени при взаимодействии $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M I}$ с $7 \cdot 10^{-3} \text{ M Cys}$ в присутствии $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ M Hb}$. Спектры регистрировали в течение суток. Растворитель — 0,05 M фосфатный буфер, pH 7,0; температура 23 °С.

На рис. 4 представлены кинетические кривые накопления HbNO для опытов, описанных выше. За сутки инкубации в системе с соединением I образуется 18,6 мкМ HbNO, т.е. 88,6% Hb перешло в HbNO. В аналогичных условиях Никорандил показал себя как препарат с более выраженным пролонгированным действием: за это время образуется только 2,36 мкМ HbNO.

Таким образом, проведённые в данной работе исследования позволяют сделать вывод о том, что соединение I при восстановлении Cys по своей эффективности превосходит в 1,5 раза препарат Нитроглицерин. В NO₂⁻ и NO-генерирующих системах

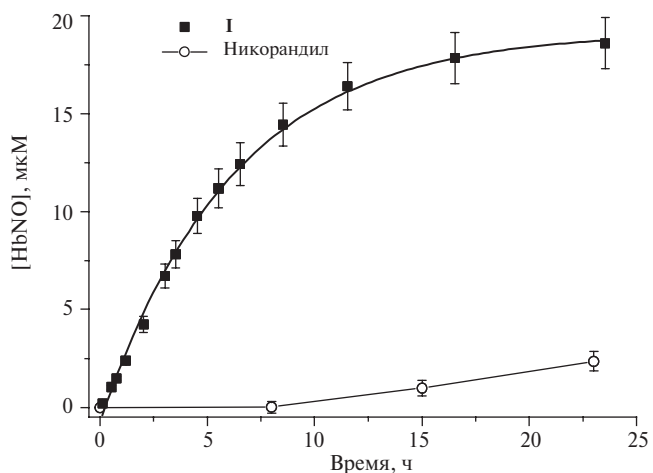


Рис. 4. Кинетические кривые накопления HbNO в системе Hb-органический нитрат — Cys. Условия как в подписи к рис. 3.

соединения **I** также является более эффективным агентом, чем Никорандил. При этом само соединение **I**, в отличие от Нитроглицерина, не вступает напрямую в окислительно-восстановительную реакцию с Hb и, следовательно, не может привести к развитию метгемоглобинемии.

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать соединение **I** для дальнейшего исследования в качестве потенциального лекарственного препарата при лечении ИБС.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта от ноября 2017 г. № 14.Н08.12.0185 в рамках мероприятия “Доклинические исследования инновационных лекарственных средств” федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” и по теме Государственного задания, № гос. регистрации № 0089–2019–0014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang P.G., Cai T.B. Taniguchi N. Nitric Oxide Donors: for Pharmaceutical and Biological Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005. 360 p.
2. Page N.A., Fung H.L. // J. Pharm. Sci. 2013. V. 102. № 9. P. 3070–3081.
3. Ignarro L.J. Nitric Oxide Biology and Pathobiology. San Diego.: Acad. Press, 2000. 1003 p.
4. RU Pat. 22502102010.
5. Неганова М.Е., Клочкова С.Г., Шевицова Е.Ф., Богатыренко Т.Н., Мищенко Д.В. // БЭБиМ. 2018. Т. 166. № 7. P. 53–57.
6. Татьянаенко Л.В., Доброхотова О.В., Варфоломеев В.Н., Фадеев М.А., Федоров Б.С., Штолько В.Н., Мищенко Д.В. // Хим.-фарм. журн. 2014. Т. 48. № 7. С. 3–6.
7. Feilisch M. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1991. V. 17. № Suppl. 3. P. S25–S33.
8. Yeates R.A., Laufen H., Leitold M. // Mol. Pharmacol. 1985. V. 28. P. 555–559.
9. Fox J.B. // Anal. Chem. 1979. V. 51. № 9. P. 1493–1502.
10. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P. // J. Clin. Invest. 2005. V. 11. № 8. P. 2099–2107.
11. Bennett B.M., Nakatsu K., Brein J.F., Marks G.S. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. 1984. V. 62. № 6. P. 704–706.
12. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in the Reactions with Ligands, in: North-Holland Research Monographs. Frontiers of Biology. Amsterdam; L., North-Holland Publ., 1971. V. 21. 436 p.
13. Geraci G., Parkhurst L.J., Gibson Q.H. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 17. P. 4664–4667.

REACTIVITY OF 2-NITROXYSUCCINATE 3-HYDROXY-6-METHYL-2-ETHYLPYRIDINE AND REFERENCE DRUGS IN MODEL NO-GENERATING SYSTEMS

O. V. Pokidova¹, E. V. Batova², A. P. Sadkov¹, A. B. Ereemeev¹,
B. S. Fedorov[†], A. I. Kotelnikov^{1,3}

¹Institute of Problem of Chemical Physics of the Russian Academy of Science, Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation

²Ivanovo State University, Ivanovo, Ivanovskaya region, Russian Federation

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS S.M. Aldoshin January 14, 2019

Received February 13, 2019

The ability of the 2-nitroxysuccinate 3-hydroxy-6-methyl-2-ethylpyridine (**I**) compound to generate nitrite ions (NO₂⁻) and nitrogen monoxide (NO) in model systems with cysteine (Cys) and deoxyhemoglobin (Hb) has been studied. It has been established that there is a more efficient release and NO from compound **I** than from Nicorandil. The accumulation rate is 1.5 times higher in the system of Cys with **I** than with Nitroglycerin. It is shown that, unlike Nitroglycerin, compound **I** is not reduced by Hb.

Keywords: Griess test, deoxyhemoglobin, nitric oxide donors, organic nitrates.