

**В. И. Левина, Н. В. Пятакова, О. Г. Бусыгина, И. С. Северина,
Н. Б. Григорьев, В. Г. Граник**

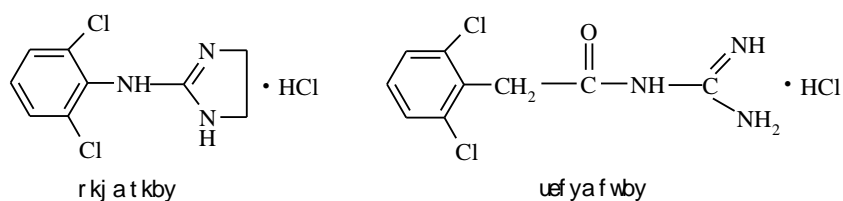
**ИЗВЕСТНЫЕ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ
КЛОНИДИН (КЛОФЕЛИН) И ГУАНФАЦИН –
НОВЫЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА**

Методом химического окисления исследуемых препаратов и последующего полярографического детектирования образующегося оксида азота NO в виде нитропруссид-аниона установлено наличие *in vitro* NO-донорных свойств у антигипертензивных лекарственных средств клонидина и гуанфацина, в структуре которых имеется гуанидиновая группировка, роднящая эти препараты с аргинином – основным субстратом фермента NO-синтазы, продуцирующей NO *in vivo*. Показано, что в исследованных условиях *in vitro* NO-донорная активность для клонидина и гуанфацина сравнима по величине с NO-донорной активностью аргинина. Обнаружено также, что гуанфацин и клонидин (последний – в присутствии NAD⁺) активируют фермент растворимую гуанилатциклазу, что является характерным признаком доноров NO. На основании полученных данных предположено, что клонидин и гуанфацин могут претерпевать ферментативное окисление до NO *in vivo* и что фармакологическое действие клонидина и гуанфацина в какой-то мере может быть связано с NO-донорными свойствами этих препаратов.

Ключевые слова: аргинин, гуанфацин, клонидин (клофелин), нитропруссид-анион, оксид азота NO, выделение, детектирование полярографическое, окисление.

Открытие значительной биологической роли оксида азота в функционировании живого организма вынуждает к рассмотрению новых аспектов физиологического действия различных известных лекарственных средств. Сегодня уже не вызывает сомнений, что биологическая активность нитроглицерина, нитросорбида и других нитратов непосредственно связана с их способностью высвобождать *in vivo* оксид азота [1]. Также достоверно установлено, что именно NO-донорная способность антигипертензивного препарата молсидомина обуславливает его фармакологическое действие. Биологическая активность оксида азота основывается на его участии в регуляции тонуса кровеносных сосудов, в ингибировании агрегации тромбоцитов, расслаблении гладких мышц кровеносных сосудов и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), регуляции деятельности дыхательной системы, ЖКТ, мочеполовой системы, стабилизации системы клеточного иммунитета и др. [2–8]. Хорошо известно, что в организме эндогенный оксид азота образуется путем окисления L-аргинина с участием ферментов NO-синтаз (NOS), и функции NO коррелируются с тремя отчетливыми формами NOS – конститутивной эндотелиальной формой (cNOS), нейрональной изоформой (nNOS) и индуцибельной (iNOS), деятельность которых включает, соответственно, регуляцию релаксации гладкой мускулатуры сосудов, нейротрансмит-

терные свойства NO и активацию макрофаговых клеток (цитотоксическое действие) [9–13]. Степень специфичности этих ферментных систем не является, по-видимому, абсолютно направленной на L-аргинин, и хорошо известно, что NO-донорная активность характерна для большого количества гуанидиновых и гуанидиноподобных систем, причем свойства этих соединений как генераторов NO проявляются не только *in vitro*, но и *in vivo* [14]. Нельзя не отметить также, что оксид азота при окислении органических молекул, в принципе, может образовываться не только при участии изоформ NOS, но и при воздействии других окислительных ферментов. Так или иначе, новое рассмотрение известных биологически активных соединений, структурные особенности которых дают возможность предполагать их способность выступать в качестве генераторов оксида азота, представляется актуальным и целесообразным. Недавно [15] нами показано, что весьма активными NO-донорами являются известные психотропные препараты – сиднофен и сиднокарб. Настоящая работа посвящена изучению NO-донорных свойств широко применяемых в медицинской практике препаратов гуанфацина и клонидина (клофелина). Исходной позицией для такого исследования является наличие в структурах этих соединений гуанидинового фрагмента – открытого в гуанфацине и циклического в клонидине, что наводит на мысль, что окислительная деградация этих препаратов может приводить к оксиду азота.

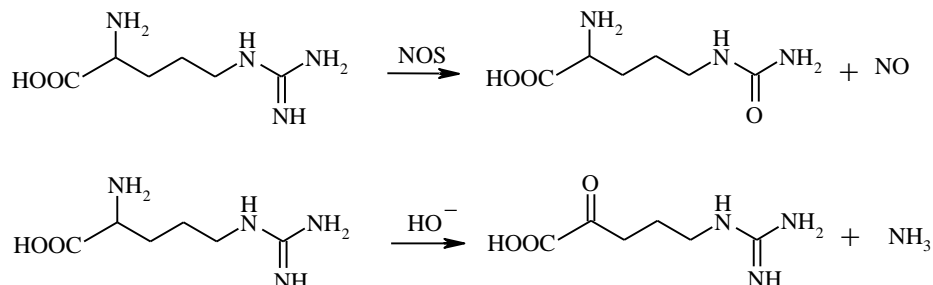


Клонидин и гуанфацин относят к препаратам, влияющим на сосудодвигательные центры [16]. Оба препарата, проникая через гематоэнцефалический барьер, стимулируют α_2 -адренорецепторы сосудодвигательных центров и уменьшают поток симпатических импульсов из центральной нервной системы, снижают высвобождение норадреналина из нервных окончаний, оказывая в определенной мере симпатолитическое действие. Таким образом, основным результатом введения обоих препаратов – гипотензивный эффект. В случае клонидина длительному гипотензивному действию может предшествовать кратковременное гипертензивное, вызванное возбуждением периферических α -адренорецепторов.

Снижению центральной адренергической активности приписывают способность клонидина снимать соматовегетативные проявления опиатной и алкогольной абстиненции, в частности, уменьшать чувство страха. Клонидин также оказывает седативный и анальгезирующий эффект вне абстинентного синдрома.

Сначала несколько слов об исследовании, посвященном химическому окислению L-аргинина феррицианидом калия [17], в котором было установлено, что преобладающий продукт окисления – α -кетокислота,

т. е., в противоположность ферментативному окислению *in vivo*, в условиях химического окисления гуанидиновая группировка не затрагивается, окисление в основном идет по α -атому углерода, аминогруппа отщепляется в виде NH_3 , а образование NO не зафиксировано.

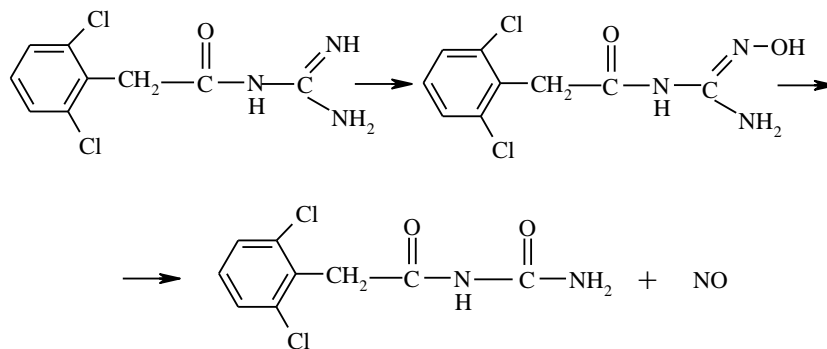


Эти результаты подвергают сомнению правомерность использования метода прогнозирования NO -донорной активности *in vivo* по химическому окислению, поэтому в данной работе результаты, полученные этим методом для клофелина и гуанфацина, были сопоставлены с результатами для L-аргинина.

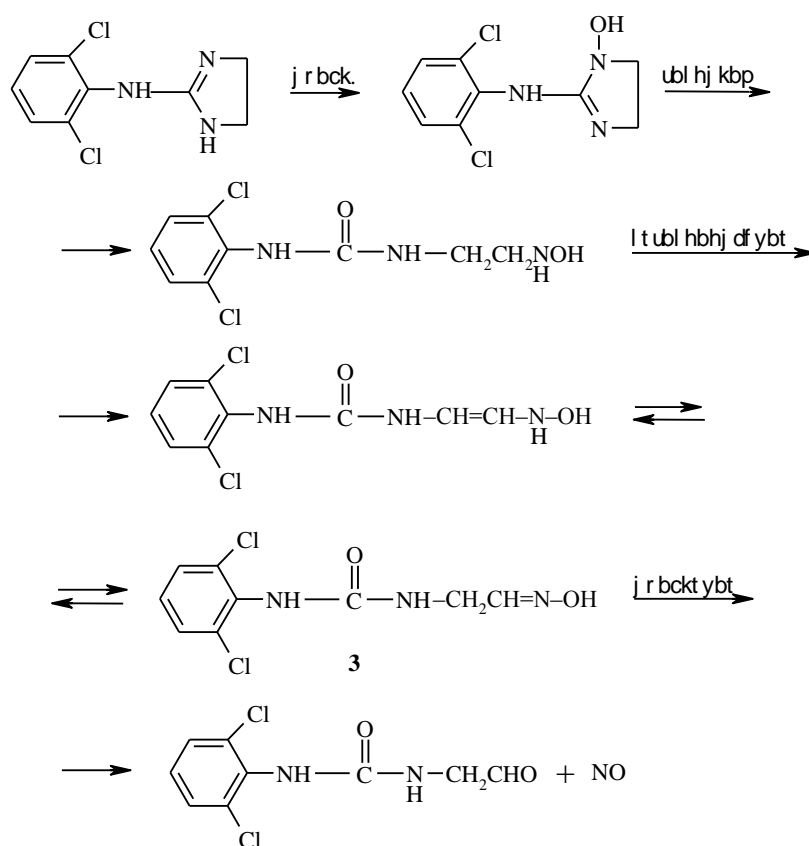
Оказалось, что при химическом окислении способны отщеплять NO все 3 соединения, но между ними обнаружилось различия, причем аргинин по NO -донорной активности занимает промежуточное место между гуанфацином и клонидином (табл. 1–3). Как следует из табл. 1, гуанфацин довольно легко отщепляет NO при окислении. Для клонидина условия протекания такого процесса удалось найти не сразу. Опыты по окислению клонидина проводили с варьированием всех условий: температуры (15–90 °С), времени (15 мин – 3 мес), pH 6–14, окислителей (феррицианид калия, перекись водорода, кислород воздуха, гемин, персульфат калия), концентрации окисляемого вещества (10^{-4} – $5 \cdot 10^{-3}$ М) и окислителя (от 10- до 1000-кратного превышения концентрации окисляемого соединения).

Известно [18], что ряд физиологических функций оксида азота в живом организме опосредован активацией фермента – растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) и накоплением цГМФ. Естественно поэтому полагать, что соединения, являющиеся NO -донорами, должны вызывать ту или иную степень активации рГЦ (в зависимости от количества высвобождаемого оксида азота). Оказалось, что и клонидин, и гуанфацин вызывают зависимость от концентрации препарата активацию этого фермента, причем, в согласии с результатами химического окисления, выраженность активации рГЦ при действии гуанфацина выше (табл. 4).

Можно предположить, что окисление гуанфацина протекает, в целом, по тому же механизму, что и окисление L-аргинина, и данный процесс может быть суммирован подобной же схемой:



Существенное осложнение для клонидина – наличие циклической имидазолиновой системы. Гипотетическая схема окисления этого препарата может выглядеть следующим образом:



Если принять эту схему, ключевой стадией процесса является стадия дегидрирования, далее образуется оксим (3), который по схеме, известной для окисления оксимов [19], трансформируется в соответствующее карбонильное соединение и оксид азота. Поскольку в среде, в которой исследуется способность соединений активировать рГЦ, присутствуют различные ферменты, в том числе и дегидрогеназы, казалось целесообразным ускорить процесс дегидрирования, добавляя кофермент NAD^+ , способный вступать в обратимые окислительно-восстановительные реакции с

Т а б л и ц а 1

Выход нитропруссид-аниона (НП) после окисления клонидина, L-аргинина и гуанфацина при 80 °С

Окислитель	Щелочность	Время, ч	Выход НП, %, для:		
			гуанфацина	клони-дина	арги-нина
K ₃ [Fe(CN) ₆], 3.5 – 10-крат.	Борат. буф. рН 10	3.5	5	0	0
	0.12 М КОН	8.5	–	0.2	–
H ₂ O ₂ , нач. конц. 1.4 М	1 М КОН	20	–	2.2	–

переносом гидрид-иона. Оказалось, что добавление NAD⁺ в количестве 10⁻⁷ М увеличивает активацию рГЦ клонидином на 22%, а в концентрации 10⁻⁶ М – на 90%, что, в известной мере, подтверждает высказанные выше предположения.

Таким образом, надежность используемого в данной работе метода прогнозирования NO-донорной активности соединения в условиях живого организма подтверждается результатами, полученными при химическом окислении как аргинина, так и гуанфацина и клонидина. Данные табл. 1–3 для аргинина наглядно показывают различие между возможностями ферментативного окисления *in vivo* и химическим окислением и объясняют допустимость применения "жестких" условий (повышенной температуры и окислителей с высоким окислительным потенциалом, рН, далеких от нейтрального). Кроме того, эти данные объясняют наблюдения, представленные в [17]: поскольку об эндогенном NO еще не было известно, его образование с низким выходом не было замечено.

В заключение необходимо отметить тот не известный ранее факт, что широко используемые в медицине лекарственные препараты гуанфацин и клонидин являются донорами оксида азота и способны активировать фермент – растворимую гуанилатциклазу, конечно, нельзя рассматривать как основание для пересмотра сложившихся представлений о механизме действия этих лекарственных средств. В то же время, обнаруженные новые данные заслуживают специального внимания фармакологов в плане целенаправленного уточнения причин фармакологического действия этих препаратов, обладающих высокой антигипертензивной активностью.

Т а б л и ц а 2

Выход нитропруссид-аниона (НП) после окисления клонидина и аргинина при комнатной температуре в течение 3 мес (21.01.–27.04)

Окислитель	Щелочность	Выход НП, %, для:	
		клони-дина	аргинина
Гемин	Небуфер. раствор	0.2	0.5
	Борат. буф., рН 9.18	0.1	0.2
K ₃ [Fe(CN) ₆], 10-крат. соотнош.	Небуфер. раствор	3	–
	Борат. буф., рН 9.18	1.5	–
H ₂ O ₂ , нач. соотнош. 10-крат.	Небуфер. раствор	0.4	–
	Борат. буф., рН 9.18	0.1	–

Выход нитропруссид-аниона (НП) после окисления клонидина и аргинина при комнатной температуре в течение 3 мес (30.04.–27.07)

Окислитель	Щелочность	Выход НП, %, для	
		клонидина	аргинина
K ₃ [Fe(CN) ₆], эквимолар.	Небуфер.раствор.	2.5	2.5
	Борат. буф., pH 9.2	4	4
H ₂ O ₂ , нач. конц. 0.25 М	Небуфер. раствор.	0	–
	Борат. буф., pH 9.2	1.8	8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химическое окисление и детектирование NO с помощью полярографического метода. Окисление исследуемых веществ проводили при их концентрации $2 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ М. Детектирование NO полярографическим методом после его связывания в виде нитропруссид-аниона $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ осуществляли по методике, описанной в [20, 21].

Биохимические испытания. Влияние соединений на активность рГЦ изучали на образце фермента, полученного из тромбоцитов человека согласно [22]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.6, содержащем 0.2 мМ дитиотрейтола, "озвучивали" на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5–78 (Великобритания) в течение 20 с при 2 °С, а затем центрифугировали 1 ч при 105 000 д. Надосадочную жидкость использовали в качестве препарата гуанилатциклазы. Активность рГЦ определяли согласно [23]. Пробы (конечный объем 150 мкл) содержали 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7.6, 1 мМ ГТФ, 4 мМ креатинфосфата, 20 мкг (120–160 ед.) креатинфосфокиназы, 10 мМ теofilлина, супернатант 105 000 д (15–20 мкг по белку) и другие добавки при необходимости. Исследуемые соединения использовали в диапазоне концентраций $10^{-7} - 10^{-4}$ М.

Количество цГМФ, образовавшегося в ходе ферментативной реакции (15 мин при 37 °С), определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов для количественного определения цГМФ фирмы АОЗТ "Биоиммуноген" (Россия).

Белок определяли по методу Бредфорд [24]. В работе использовали ГТФ-натриевую соль ("Fluka", Швейцария). Остальные реактивы фирмы Sigma, США.

Влияние клонидина и гуанфацина на активацию рГЦ

Тестируемая система	Активация рГЦ при концентрации исследуемого препарата			
	10^{-7} М	10^{-6} М	10^{-5} М	10^{-4} М
Клонидин	–	1.0	0.9	1.3
Клонидин + НАД ⁺ (10^{-7} М)	–	–	1.1	–
Клонидин + НАД ⁺ (10^{-6} М)	–	–	1.7	–
Гуанфацин	1.7	1.8	1.4	1.2
Гуанфацин + НАД ⁺ (10^{-6} М)	1.3	1.4	–	–

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Г. Граник, С. Ю. Рябова, Н. Б. Григорьев, *Успехи химии*, **65**, 792 (1997).
2. S. Moncada, E. A. Higgs, *Eur. J. Clin. Invest.*, **21** (4), 361 (1991).
3. S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109 (1991).
4. J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science*, **258**, 1898 (1992).
5. C. Nathan, *FASEB J.*, **6**, 3051 (1992).
6. F. Murad, *Neurotransmissions*, **10**, No. 2, 1 (1994).
7. B. Brune, S. Dimmeler, L. Molina y Vedia, E. G. Lapetina, *Life Sci.*, **54**, 61 (1994).
8. R. M. Clancy, S. B. Abramson, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **210**, 93 (1995).
9. O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 707 (1995).
10. C. Nathan, Q. Xie, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13725 (1994).
11. M. A. Marletta, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12231 (1993).
12. D. J. Stuehr, H. M. Abu-Soud, D. L. Rousseau, P. L. Feldman, J. Wang, *Adv. Pharmacol.*, **34**, 207 (1995).
13. D. A. Wink, M. B. Grisham, J. B. Mitchell, P. C. Ford, *Methods. Enzymol.*, **268**, 12 (1996).
14. V. G. Granik, N. B. Grigoriev, L. H. Vinograd, I. S. Severina, M. D. Mashkovskiy, V. B. Nikitin, G. N. Engalycheva, M. A. Kalinkina, O. G. Busigina, *Mendeleev Commun.*, 161 (1996).
15. В. И. Левина, Н. Б. Григорьев, В. Г. Граник, *ХГС*, в печати.
16. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Медицина, Москва, 1993, **1**.
17. D. Laloo, M. K. Mahanti, *Pol. J. Chem.*, **60**, 589 (1986).
18. И. С. Северина, *Биохимия*, **63**, 939 (1998).
19. L. N. Koikov, N. V. Alexeeva, E. A. Lisitza, E. S. Krichevsky, N. B. Grigoryev, A. V. Danilov, I. S. Severina, N. V. Pyatakova, V. G. Granik, *Mendeleev Commun.*, 165 (1998).
20. В. И. Левина, Д. А. Григорьев, Н. Б. Григорьев, *Хим.-фарм. журн.*, № 8, 55 (1995).
21. В. И. Левина, А. В. Данилов, Н. Б. Григорьев, *Хим.-фарм. журн.*, № 4, 53 (1998).
22. Ю. Ю. Чирков, И. А. Тыщук, Н. Н. Белушкина, И. С. Северина, *Биохимия*, **52**, 956 (1987).
23. D. L. Garbers, F. Murad, *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57 (1979).
24. M. M. Bradford, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248 (1976).

Государственный научный центр РФ
"НИОПИК", Москва 103787, Россия
e-mail: makar-cl@ropnet.ru

Поступило в редакцию 21.03.2000