

Рис. 2. Динамика накопления треонина (1, 2) и утилизация редуцирующих веществ (3, 4) при биосинтезе треонина культурой *E. coli* в лабораторном ферментере. Среда: 1, 4 – на основе гидролизата кормовых дрожжей, 2, 3 – на основе гидролизата паприны

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ КАНДИДАТОВ В БЛОКАТОРЫ ПРОСТАНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ EP- и DP-ТИПА

The structure and functional analysis of 8 novel synthetic analogs of PGA_2 and 11-deoxy-PGE₁ was performed. Two prostanoids possessing the properties of «partial» blockers of receptors of EP₂- and DP-type were found and described. The structures given could create the basis for the chemical synthesis of high-effective and specific blockers of the next generation.

Простагландины (ПГ) - биологически активные метаболиты арахидоновой кислоты, являющиеся модуляторами клеточных функций при различных физиологических и патологических состояниях [1]. Реализация биологических эффектов ПГ осуществляется восьмью типами простаноидных рецепторов (DP, EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, FP, IP, TP), каждый из которых обеспечивает участие данных соединений в регуляции строго определенной группы функциональных ответов клеток-мишеней [2]. Высокая активность ПГ предполагает потенциальную возможность их использования в медицинской практике

ке, а также в экспериментальных исследованиях в качестве тонких регуляторов физиологических и биохимических процессов. Вместе с тем относительно низкая биологическая селективность природных ПГ серьезно затрудняет их практическое использование, являясь основной причиной возникновения ряда нежелательных побочных эффектов (головная боль, тошнота, аритмия) [3]. Широко используемые в этих случаях нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты (аспирин, индометацин) являются ингибиторами циклооксигеназы — ключевого фермента биосинтеза ПГ [4]. Блокада данного фермента приводит к остановке синтеза ПГ всех групп, тогда как зачастую необходимо и достаточно заблокировать действие лишь одного из них. Для более специфической нейтрализации нежелательных эффектов простагландинов необходимы блокаторы простаноидных рецепторов, участвующих в передаче их биологических сигналов. Число таких соединений в настоящее время весьма ограничено [5]. Таким образом, создание высокоспецифичных блокаторов рецепторов ПГ не только расширит существующие представления о вовлеченности простаноидных рецепторов в патологические и физиологические процессы клетки, но и обеспечит новую стратегию использования простагландинов в терапии.

Известно, что любые преобразования циклопентанового кольца и боковых цепей природных ПГ относят к числу существенных химических изменений, способных значительно модифицировать функциональную активность соединения [6]. В связи со сказанным настоящая работа посвящена поиску и сравнительной характеристике новых кандидатов в блокаторы простаноидных рецепторов *EP*- и *DP*-типа в ряду синтетических аналогов ПГА₂ и 11-дезоксипГЕ₁.

Материал и методика

В работе использованы ПГЕ₁, ПГЕ₂, ПГD₂, а также синтезированные по методике [7, 8] в лаборатории химии простагландинов ИБОХ НАНБ следующие простаноиды: **ТЯ-240** - метиловый эфир 13,15-(3',5'-изоксазола)-9-оксопростановой кислоты; **ТЯ-30** - метиловый эфир 13,15-(3',5'-изоксазолино)-9-оксо-15-фенил-16,17,18,19,20-пентанорпростановой кислоты; **ТЯ-287**-метиловый эфир 13,15-(3',5'-изоксазолино)-9-оксо-15-(N-пирролидон-2''-ил)-16,17,18,19,20-пентанорпростановой кислоты; **ТЯ-263** - метиловый эфир 13,15-(7a-метокси-4-оксо-3a,4,5,6,7,7a-гексагидробензо[d]изоксазол-3-ил)-9-оксо-16,17,18,19,20-пентанорпростановой кислоты; **ТЯ-239** - метиловый эфир 13-амино-13,14-дегидро-9,15-диоксо-15-фенил-16,17,18,19,20-пентанорпростановой кислоты; **Ю-34** - 3-изобутокси-2-метил-5-(2-оксо-4-амино-окт-3(E)-енил)-4-(6-карбоксихекс)-2(Z)-енил-2-циклопентен-1-он; **Ю-26** - 3-изобутокси-2-метил-5-(2-оксо-4-амино-окт-3(E)-енил)-4-(гидроксигепт-2-(Z)-енил)-2-циклопентен-1-он; **ПЕ-7** - 4-(4-оксидецин-2-ил)-5-(1-оксигептин-5-ил)-3-изобутокси-2-метил-циклопент-2-енон.

Активность простаноидов оценивали по вызываемой ими ответной реакции аденилатциклазной системы (АЦС) плазматических мембран гепатоцитов. Выделение гепатоцитов проводили погласно [9]. Плазматические мембраны получали, как описано в [10]. Белок определяли по методу [11]. Активность аденилатциклазы (АЦ) оценивали по количеству цАМФ, накопленному в ходе 15-минутной инкубации мембранного препарата (8-10 мкг белка) в стандартной среде инкубации, содержащей 25 ммоль/л *Nepes* NaOH (рН 7,5), 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л MgCl₂, 0,1 ммоль/л изобутилметилксантина, 1 ммоль/л АТФ, 5 ммоль/л креатинфосфата, 125 МЕ/мл креатинкиназы, 0,1 ммоль/л гуанозинтрифосфата (ГТФ), 10 мкмоль/л спиртового раствора соответствующего ПГ или простаноида. Содержание цАМФ определяли методом радиоиммунного анализа [12]. Статистическая обработка результатов (подсчет ошибки средней арифметической и достоверности) выполнена с помощью пакета программ Stadia 6.0.

Результаты и их обсуждение

Известно, что из восьми известных типов простаноидных рецепторов в плазматических мембранах гепатоцитов наиболее широко представлены рецепторы EP - и DP -типов, ассоциированные с АЦС сигнальной трансдукции [13]. Существующий в настоящее время перечень доступных блокаторов рецепторов указанных типов ограничен двумя соединениями: АН 6809 (6-изопропокси-9-оксоксантен-2-карбоксилат) и ВАУ-и3405, причем наиболее полно охарактеризовано первое [5]. Показано, что АН 6809 эффективно блокирует ПГЕ₂-индуцированное накопление цАМФ в клетках линии COS, подвергнутых трансфекции EP_2 -рецептором человека [14]. У мышей АН 6809 проявляет чрезвычайно высокое сродство к EP_2 -рецепторам и практически нулевую активность по отношению к рецепторам DP_1 -типа [15]. В то же время на модели тромбоцитов человека показано, что АН 6809 является эффективным антагонистом антиагрегационного действия ПГD₂ [16]. Таким образом, соединение АН 6809 было использовано нами в качестве эталон-блокатора рецепторов EP_2 и DP -типа.

В ранее проведенных исследованиях нами было изучено биологическое действие семи простаноидов группы А и 14 аналогов 11-дезоксипГЕ₁ среди которых выявлены: а) агонисты простаноидных рецепторов, б) ингибиторы АЦ, в) вещества, не оказавшие влияния на синтез цАМФ [17, 18]. Последняя группа соединений привлекла наше внимание благодаря тому, что блокаторы рецепторов гормонов не реализуют свое действие через рецепторы и сопряженные с ними каскады сигнальной трансдукции, т. е. их «внутренняя» активность отсутствует [19]. В то же время их фармакологическая активность определяется способностью предотвращать эффекты

эндогенных лигандов и (или) экзогенных агонистов. С учетом этого свойства мы предположили, что простаноид ТЯ-240, принадлежащий группе аналогов 11-дезоксипГЕ₁, и циклопентеноновый аналог ПЕ-7 могут проявить свойства блокаторов рецепторов EP -и (или) DP -типа.

Для проверки сделанного предположения были изучены эффекты ПГЕ₁, ПГЕ₂ и ПГD₂ в присутствии названных простаноидов и коммерческого блокатора АН 6809. На первом этапе была измерена ответная реакция системы рецептор — G-белок — АЦ на действие природных ПГ групп Е и D. Установлено, что ПГЕ₁, ПГЕ₂ и ПГD₂ не оказывают влияния на базальную активность фермента, тогда как внесение ГТФ (10^{-4} моль/л) приводит к стимуляции синтеза цАМФ этими ПГ на 214, 153 и 116 % соответственно, что хорошо согласуется с данными литературы [20].

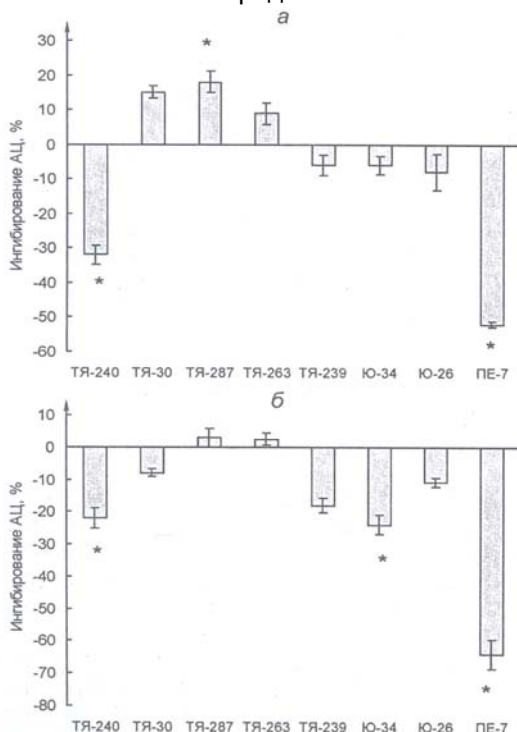


Рис. 1. Влияние аналогов 11-дезоксипГЕ₁ и ПГА₂ на активность АЦ плазматических мембран гепатоцитов, стимулированную ПГЕ₁ и ПГЕ₂. Контролем служила активность аденилатциклазной системы, стимулированная: а — ПГЕ₁ (10^{-5} моль/л); б — ПГЕ₂ (10^{-5} моль/л).
* Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n=6$)

На рис. 1 а представлены результаты экспериментов по изучению совместного действия ПГЕ, и соответствующих простаноидов. Установлено, что 11-дезоксид-аналог ТЯ-240 в концентрации 10^{-5} моль/л вызывал достоверное снижение эффекта ПГЕ, (32 % к контролю). В присутствии аналога ПЕ-7 активация АЦ, вызванная этим ПГ, подавлялась на 53 %. Простаиноиды проявили аналогичный эффект блокады и по отношению к действию ПГЕ₂ (рис. 1 б). Достоверное ингибирование активности АЦ в данной серии наблюдалось также при использовании аналога Ю-34, который в данном тесте практически равноактивен простаиноиду ТЯ-240.

Принципиально иным оказался эффект аналога ТЯ-287. Установлено, что данное соединение способно достоверно усиливать эффект ПГЕ, (см. рис. 1 а). Для объяснения описанного эффекта необходимо обратиться к анализу функциональности систем сигнальной трансдукции, обеспечивающих регуляцию синтеза цАМФ. Известно, что передача в клетках печени сигнала ПГ группы Е, сопряженная с активацией Gs-белком АЦ, обеспечивается рецепторами EP- и DP-типов [13]. Установлено также, что в зависимости от эффективности связывания ПГЕ, рецепторы указанных типов образуют следующий ряд: EP₂=EP₄>>DP [13]. Таким образом, наблюдаемое при действии природного ПГ увеличение синтеза цАМФ является результатом активации ими рецепторов прежде всего EP-типа. В то же время химические модификации простаиноидной молекулы, проведенные в процессе создания 11-дезоксид-аналогов, могли обеспечить повышение сродства некоторых из полученных соединений к ОР-рецепторам. В связи с этим наблюдаемое явление аддитивности может рассматриваться как

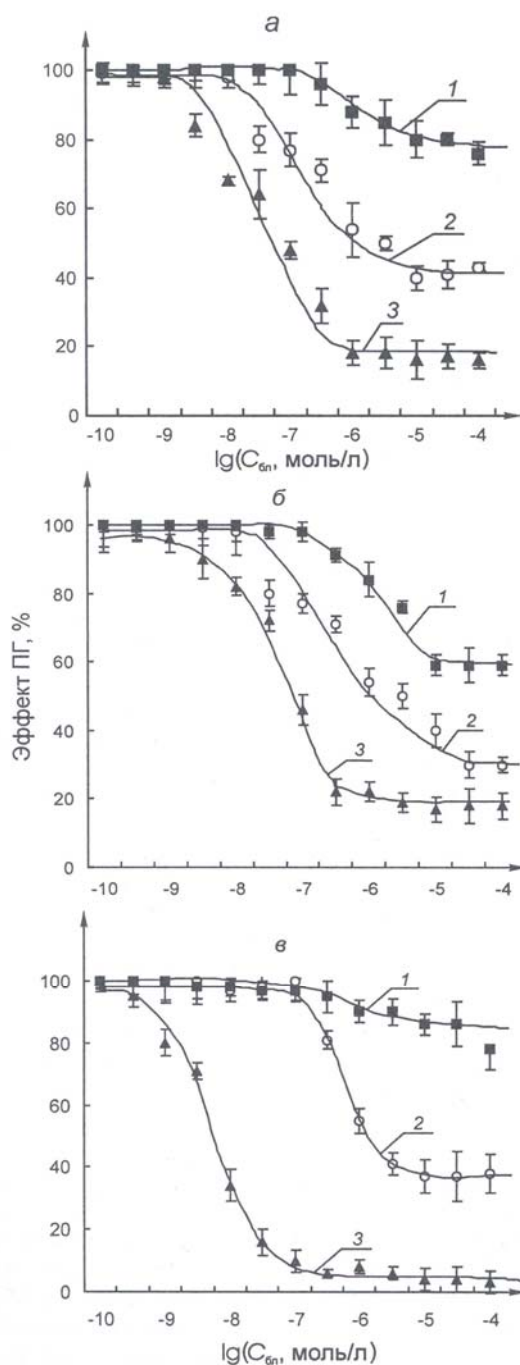


Рис. 2. Эффективность действия соединения АН 6809, циклопентенонового простаиноида ПЕ-7 и 11-дезоксид-аналогов ТЯ-240 в присутствии:
а – ПГЕ₁; б – ПГЕ₂; в – ПГD₂. 1 – ТЯ-240, 2 – ПЕ-7, 3 – АН 6809

результат активации природным ПГ и его 11-дезоксид-аналогом как минимум двух различных систем сигнальной трансдукции, обеспечивающих независимый синтез цАМФ.

Кинетические параметры, характеризующие действие блокатора АН 6809 и простаноидов ПЕ-7 и ТЯ-240

Соединение, 10^{-5} моль/л	V_{\max} , пмоль цАМФ/мг·мин $X \pm Sx$	V_{\min} , пмоль цАМФ/мг·мин $X \pm Sx$	IC_{50} , моль/л
ПГЕ ₁ , 10^{-5} моль/л			
ТЯ-240	2,14±0,05	1,62±0,02	$9,1 \cdot 10^{-7}$
ПЕ-7	2,12±0,05	1,52±0,07	$5,0 \cdot 10^{-7}$
АН 6809	2,12±0,06	1,14±0,03	$6,4 \cdot 10^{-8}$
ПГЕ ₂ , 10^{-5} моль/л			
ТЯ-240	2,01±0,07	1,41±0,04	$9,5 \cdot 10^{-7}$
ПЕ-7	2,04±0,02	1,52±0,03	$7,3 \cdot 10^{-7}$
АН 6809	1,97±0,02	1,16±0,04	$8,1 \cdot 10^{-8}$
ПГD ₂ , 10^{-5} моль/л			
ТЯ-240	1,82±0,03	1,41±0,06	$7,1 \cdot 10^{-7}$
ПЕ-7	1,85±0,02	1,38±0,04	$9,2 \cdot 10^{-7}$
АН 6809	1,81±0,04	1,14±0,08	$6,2 \cdot 10^{-8}$

Примечание. Приведенные данные представляют собой результат математической обработки трех независимых экспериментов. V_{\max} и V_{\min} – максимальная и минимальная активность аденилатциклазы.

Далее было проведено сравнительное исследование эффективности простаноидов ПЕ-7 и ТЯ-240. В качестве эталона был использован АН 6809. Как следует из представленных на рис. 2 (где $C_{\text{бл}}$ – концентрация блокатора) и в таблице данных, в зависимости от силы блокирующей способности тестируемые соединения образуют следующий ряд эффективности: ТЯ-240 << ПЕ-7 < АН 6809.

Действительно, снижение активности АЦ, стимулированной ПГЕ₁ и ПГD₂, в присутствии аналога ТЯ-240 не превышала 30 %, а стимулированной ПГЕ₂ – 38 %, в то время как в присутствии аналога ПЕ-7 данный параметр достигал 60 %. Примечательно, что, несмотря на разницу в величинах проявляемых эффектов, указанные аналоги имели относительно одинаковые величины констант полуингибирования (IC_{50}), находившиеся в диапазоне концентраций $5,0 \div 9,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Что касается соединения АН 6809, то его действие значительно превосходило эффекты простаноидов, о чем свидетельствует полное подавление функциональных эффектов как ПГ группы Е, так и ПГD₂ (см. рис. 2), причем активация АЦ в присутствии последнего подавлялась при прочих равных условиях более селективно (см. таблицу),

Таким образом, характеристика свойств аналогов ПЕ-7 и ТЯ-240 позволяет определять их только как «частичные» блокаторы рецепторов простаноидного типа (EP_2 , DP -рецепторы), при этом использование ПЕ-7 для нейтрализации эффектов природных ПГ является, безусловно, предпочтительным. Обращаясь к структуре данного соединения, необходимо отметить принадлежность его к ацетиленовому ряду аналогов ПГА по α - и ω -боковым цепям. В то же время наличие изоксазола в 13-м положении неразветвленной насыщенной ω -цепи 11-дезоксид-аналога ТЯ-240 также обеспечивает ему возможность конкурентного связывания с EP_2 - и DP -рецепторами и частичной нейтрализации эффектов природных агонистов.

Таким образом, в ходе проведенной работы выявлены два соединения, проявляющие свойства «частичных» блокаторов EP_2 - и DP -рецепторов. Одно из них (ПЕ-7), принадлежащее к группе ацетиленовых циклопентеноновых простаноидов, характеризовалось способностью подавлять действие природных ПГ на 60 %. Второе (ТЯ-240), относящееся к аналогам 11-дезоксид-ПГЕ₁, характеризовалось наличием изоксазола в 13-м положении ω -цепи и инги-

бировало АЦС в присутствии ПГ групп E и D на 20 и 40 % соответственно. Выявленные структуры могут являться основой для создания высокоэффективных и специфических блокаторов нового поколения.

Работа выполнена при поддержке фонда INTAS (грант 03-51-4813) и Белорусской государственной программы «Физиологически активные вещества».

1. Губич О.И., Шолух М. В. / Биохимия. 2006. Т. 71. №3. С. 293.
2. Breyer R.M., Bagdassatian C.K., Myers S.A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001. Vol. 41. № 1. P. 661.
3. Шульцев Г. П. Простагландины и их клиническое значение. М., 1983. С. 12.
4. Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т., Муратов В. К. // Молекуляр. основы действия ферментов. 1985. № 1. С. 3.
5. Гафуров Р.Г., Любовская Э.Б., Остроухое Б. И . Химия простагландинов в патентах. М., 1984. С. 180.
6. Толстиков Г.А., Мифтахов М.С., Лазарева Д. Н. Простагландины и их аналоги в репродукции животных и человека. Уфа, 1989. С. 21.
7. Лахвич Ф.А., Пашковский Ф. С, Королева Е.В. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 456.
8. Лис Л.Г., Желдакова Т.А., Пап А. А. // ЖорХ. 1992. Т. 28. № 9. С. 1854.
9. Berry M. N., Friend D.S. // J. Cell Biol. 1969. Vol. 43. № 3. P. 506.
10. Nieto J.L., Diaz -Laviada I., Guillen A. // Cell Signal. 1996. Vol. 8. №4. P. 317.
11. Peterson G. L. // Methods Enzymol. 1983. Vol. 91. P. 95.
12. Губич О.И., Шолух М. В. // Вестн. БГУ. 2003. Сер. 2. № 2. С. 11.
13. Coleman R.A., Smith W. L., Narumiya S. // Pharmacol. Rev. 2000. Vol. 46. № 2. P. 205.
14. Woodward D.F., Pepperl D.J. // Biochem. Pharmacol. 1995. Vol. 50. P. 1731.
15. Kiriyaama M., Ushikubi F., Kobayashi T. // Br. J. Pharmacol. 1988. Vol. 94. P. 745.
16. Keery R.J., Lumley P. // Br. J. Pharmacol. 1988. Vol. 94. P. 745.
17. Губич О.И., Королева Е.В., Чернихова Т.В., Шолух М. В. // Новости мед.-биол. наук. 2004. № 4. С. 64.
18. Hubich A.I., Zheldakova T.A., Chernikhova T.V. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 341. P. 357.
19. Сергеев П. В. Биохимическая фармакология. М., 1982. С. 51.
20. Ungrin M., Carriere M. C, Denis D. // Mol. Pharmacol. 2001. Vol. 59. P. 1446.

Поступила в редакцию 27.06.06.

Оксана Игоревна Губич - ассистент кафедры биохимии.

Михаил Васильевич Шолух - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ биохимии обмена веществ.