

гибируют фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов [10, 11]. С другой стороны, 3-оксипиридины являются ингибиторами перекисного окисления липидов, причем установлена связь между их антирадикальной и радиозащитной активностью [12—16]. Наряду с окислением полиеновых жирных кислот непосредственно в составе фосфолипидов, приводящим к образованию гидроперекисей фосфолипидов, в клетке протекают реакции окисления свободных полиеновых жирных кислот, конечными продуктами которого являются лейкотриены [17] и простагландины [18]. Регуляторное действие последних реализуется, как полагают, через систему циклических нуклеотидов [19].

Таким образом, эффекты 3-оксипиридинов могут быть обусловлены, во-первых, изменением содержания циклических нуклеотидов за счет их действия как ингибиторов фосфодиэстеразы и ингибиторов свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов, катализируемых циклооксигеназой [20], и, во-вторых, их собственно антиоксидантным действием, т. е. предотвращением окисления фосфолипидов в биомембранах [1, 3, 12, 16, 21].

Для того чтобы выяснить, какие из этих механизмов действия 3-оксипиридинов реализуются в тех или иных физиологических условиях или терапевтических эффектах, необходимо иметь возможность сравнивать их антиоксидантные свойства со способностью ингибировать фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов. Если антирадикальные и антиоксидантные свойства 3-оксипиридинов достаточно изучены, то действие 3-оксипиридинов на фосфодиэстеразу до сих пор практически не исследовано [22].

В настоящей работе исследовано действие 14 природных и синтетических производных пиридина, содержащих разные заместители как в кольце, так и в алифатической части молекулы и имеющих существенно разные антиоксидантные свойства, на активность Ca^{2+} -независимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца кролика (ФДЭ-II).

Методика

Ca^{2+} -независимую фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов выделяли из сердца кролика по опубликованному методу [23]. Опре-

деление фосфодиэстеразной активности проводили по методу, описанному в работе [24].

10 мкл раствора ФДЭ-II (4,1—4,3 мкг белка) вносили в инкубационные пробы (конечный объем 50 мкл), содержащие 5 мМ MgCl_2 , 20 мМ трис- HCl (рН 8,0), от 10^{-6} до $1,6 \times 10^{-5}$ М цАМФ и 0,5 мкКи ^3H -цАМФ, 10^{-4} — 10^{-2} М исследуемого соединения. Водонерастворимые ингибиторы растворяли в этаноле (конечная концентрация которого в среде инкубации была 1,7 М). В контрольных пробах этанол присутствовал в той же концентрации. Инкубацию проводили в течение 5 мин при 37 °С. Реакцию останавливали на нанесением 10 мкл инкубационной смеси на сульфоловую пластинку «Silulof UV-254» (ЧССР) в точки, в которые предварительно вносили в качестве свидетелей по 10 мкл растворов цАМФ и АМФ в концентрациях примерно 10^{-3} М. Продукты гидролиза разделяли хроматографией в смеси растворителей изопропанол—вода—аммиак в объемных соотношениях 7:2:1. Пятна нуклеотидов выявляли под ультрафиолетовым светом, вырезали, помещали во флаконы для определения радиоактивности, заливали 0,5 мл дистиллированной воды и оставляли элюироваться 40—60 мин. Потом в каждый флакон вносили по 5 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8. Измерение радиоактивности проводили в сцинтилляционном счетчике «Magk-11» по каналу ^3H .

Эксперименты по установлению обратимости или необратимости действия ингибитора проводили следующим образом. Фосфодиэстеразу преинкубировали в среде, содержащей 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ ингибитора, 20 мМ трис- HCl (рН 8,0) при 37 °С в течение 0—30 мин (объем 50 мкл), затем аликвоты (по 2 мкл) переносили в среду инкубации (состав см. выше). Содержание белка составляло 1,5—2,2 мкг в пробе, концентрация ингибитора 4·10⁻⁴ М. Инкубировали 15 мин при 37 °С, после чего измеряли фосфодиэстеразную активность описанным выше способом.

В работе использовали трис, ЭДТА, ДЭАЭ, целлюлозу, цАМФ и АМФ фирмы «Reanal», ^3H -цАМФ фирмы «Amersham» (Англия). Для сравнения с производными пиридина использовали известные ингибиторы фосфодиэстеразы изобутилметилксантин и теofilлин («Sigma») и природные аналоги производных пиридина — пиридоксаль (Научно-производственное объединение «Витамины»), пиридоксол и пиридоксальфосфат (Краснодарский комбинат биохимических и восстановительных препаратов). Остальные вещества — производства «Союзреактив». Производные пиридина синтезированы в Институте химической физики АН СССР. Методики синтеза и свойства этих веществ, а также их очистки описаны в работах [25—30]. В работе использовали производные пиридина с заместителями в различных положениях: 3-оксипиридин: 2-Н,3-ОН,4-Н,5-Н,6-Н (I); 2-третбутил-3-оксипиридин: 2-С(CH₃)₃, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-Н (II); 2,6-диметил-3-оксипиридин: 2-СН₃, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-СН₃ (III); 2-третбутил-6-метил-3-оксипиридин: 2-С(CH₃)₃, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-СН₃ (IV); 2-этил-6-метил-3-оксипиридин: 2-С₂H₅, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-СН₃ (V); 2-фенил-3-оксипиридин: 2-С₆H₅, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-Н (VI); 2-бензил-3-оксипиридин: 2-СН₂-С₆H₅, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-Н (VII); 6-метокси-2-фенил-3-окси-

пиридин: 2-С₆H₅, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-О-СН₃ (VIII); 6-метокси-2-бензил-3-оксипиридин: 2-СН₂-С₆H₅, 3-ОН,4-Н,5-Н,6-О-СН₃ (IX); 3-аминопиридин: 2-Н,3-О-Н,4-Н,5-Н,6-Н (X); 2,4,6-триметилпиридин: 2-СН₃, 3-Н,4-СН₃,5-Н,6-СН₃ (XI); пиридоксол: 2-Н,3-СН₂ОН,4-СН₂ОН,5-ОН,6-СН₃; пиридоксальфосфат: 2-Н,3-СН₂-О-Н₂PO₃,4-СНО,5-ОН,6-СН₃; пиридоксаль: 2-Н,3-СН₂ОН,4-СНО,5-ОН,6-СН₃. Белок определяли по методу Лоури [31].

Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности ингибиторов ФДЭ-II использовали величину $K_{0,5}$, значение которой для каждого ингибитора определялось такой его концентрацией, при которой эффект торможения составлял 50% от эффекта торможения при той концентрации ингибитора, дальнейшее увеличение которой не приводило к усилению ингибирования.

Как видно из таблицы, практически все производные 3-оксипиридина (кроме него самого) ингибируют ФДЭ-II из сердца кролика, причем эффективность производных 3-оксипиридина не коррелирует с их антирадикальной активностью (характеризуемой величиной K_7 — константой скорости реакции ингибитора с перекисными радикалами), а также гидрофобностью, характеризующей коэффициентом распределения (P) в системе октанол — вода. Производные 3-оксипиридина образуют ингибируют ФДЭ. На рис. 1 вид-

Торможение ФДЭ циклических нуклеотидов производными пиридина, их антирадикальная активность и гидрофобность

Соединение	$K_7 \cdot 10^{-4}$ моль ⁻¹ ·с ⁻¹ [14, 16]	P [39]	$K_{0,5}$ (M): [цАМФ] = 10^{-6} М	$K_{0,5}$ (M): [цАМФ] = 10^{-6} М	Остаточная активность при максимальной концентрации ингибитора (M), в % по отношению к контролю
I	0,1	2,9	—	—	Нет эффекта
II	4,2	245	1,3·10 ⁻¹	4,0·10 ⁻⁴	63±1
III	6,5	4,5	10 ⁻³	5·10 ⁻³	65±10
IV	3,4	449	4,0·10 ⁻¹	10 ⁻³	20±3
V	8,5	12,4	1,3·10 ⁻¹	1,6·10 ⁻¹	32±3
VI	1,5	—	1,3·10 ⁻¹	3,2·10 ⁻¹	55±3
VII	0,6	—	8,0·10 ⁻¹	Нет эффекта	75±1
VIII	—	—	4,0·10 ⁻¹	6,3·10 ⁻⁴	35±2
IX	62,5	—	2,5·10 ⁻¹	3,2·10 ⁻⁴	65±15
X	—	—	5·10 ⁻¹	4·10 ⁻³	55±3
XI	—	—	4·10 ⁻¹	6,3·10 ⁻³	40±3
Пиридоксол	—	—	10 ⁻⁴	2,5·10 ⁻¹	50±3
Пиридоксаль	—	—	—	—	Нет эффекта
Пиридоксальфосфат	—	—	—	—	Нет эффекта
Теofilлин	—	—	1,3·10 ⁻³	1,3·10 ⁻³	20±3
Изобутил-метилксантин	—	—	2,5·10 ⁻⁵	2,5·10 ⁻⁵	10±1

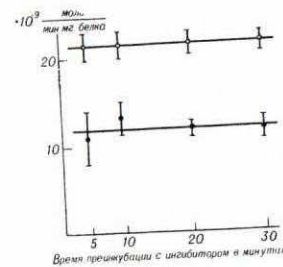


Рис. 1. Влияние времени инкубации фермента с ингибитором на активность фермента. Соединение VIII (4·10⁻⁴ М) в среде инкубации.

1 — фермент преинкубировали без ингибитора; 2 — с ингибитором. По оси ординат — активность ферментов (в моль × 10³ / мг белка × 10⁻⁴); по оси абсцисс — время инкубации с ингибитором (в мин).

но, что эффект торможения ферментативной активности не развивается во времени (представлены результаты для соединения VIII). Другие производные 3-оксипиридина действуют аналогичным образом.

Результаты, приведенные в таблице, показывают, что ингибирующее действие производных 3-оксипиридина проявляется сильнее при большей концентрации субстрата. Из этого следует, что производные 3-оксипиридина являются неконкурентными ингибиторами ФДЭ. Физиологический предшественник пиридоксала и пиридоксальфосфата — пиридоксол (витамин В₆) обладает незначительным ингиби-

рующим действием на ФДЭ-II, а сами пиридоксаль и пиридоксальфосфат ингибиторами ФДЭ-II не являются.

Из данных литературы известно, что Ca^{2+} -независимая фосфодиэстераза циклических нуклеотидов имеет двухфазную кинетику [32—35]. Существует предположение, что у этой формы ФДЭ есть центр связывания цАМФ, отличный от каталитического [34, 35]. При повышении концентрации субстрата в среде инкубации до некоторого уровня цАМФ начинает связываться с этим регуляторным центром, в результате чего изменяется конформация фермента и активируется гидролиз цАМФ.

В соответствии с другим предположением, аномальная кинетика Ca^{2+} -независимой ФДЭ обусловлена наличием двух форм этого фермента с высоким и низким родством к цАМФ [36, 37], разделения которых добиться не удалось.

Как видно на рис. 2, гидролиз цАМФ ФДЭ-II из сердца кролика протекает по немихаэлисовской кинетике. Он показывает также, что при более высоких концентрациях субстрата соединение V оказывает более выраженное ингибирующее действие, чем при низких, что полностью соответствует данным, приведенным в таблице.

Из кинетических кривых, представленных на рис. 2, видно, что в присутствии ингибитора кинетическая кривая имеет тот же характер, что и в его отсутствие, однако нарастание активности фермента наступает при более высоких концентрациях фермента по сравнению с контролем. Поскольку характер кинетической кривой в при-

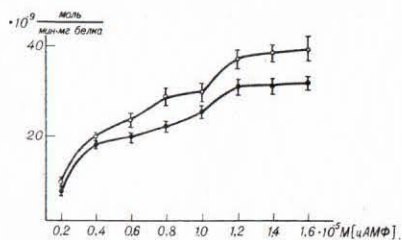


Рис. 2. Влияние субстрата в различных концентрациях на ингибирующее действие соединения V (10^{-3} М).

1 — активность в отсутствие ингибитора, 2 — в его присутствии.
По оси ординат — активность фермента (в моль \times 10^{-9} мин $^{-1}$ мг белка $^{-1}$); по оси абсцисс — концентрация цАМФ (в 10^{-9} М).

сутствии ингибитора не меняется, из результатов эксперимента нельзя сделать вывод, объясняется ли более выраженное ингибирование при более высокой концентрации субстрата наличием 2 форм фермента, из которых форма ФДЭ-II с меньшим родством к цАМФ более чувствительна к ингибирующему действию 3-оксипиридинон, чем «высокоаффинная» форма фермента, или тем, что 3-оксипиридинон имеют большее родство к цАМФ-связывающему участку фермента, чем к каталитическому.

Ингибирование ФДЭ 3-оксипиридинами нельзя объяснить их антиоксидантным действием, так как антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина не коррелируют с их ингибирующим действием на ФДЭ (см. таблицу). Сходные результаты получены в работе [38], в которой исследовалось действие производных токоферола на ФДЭ. Авторы считают, что ингибирование ФДЭ производными токоферола связано с наличием у них метильных групп, а не с антирадикальной активностью.

Оксигруппы в составе 3-оксипиридинон также не являются ответственными за эффект ингибирования ФДЭ-II, так как 3-оксипиридин не эффективен как ингибитор ФДЭ-II, а 3-аминопиридин и 2,4,6-триметилпиридин, не содержащие оксигруппы, тормозят активность ФДЭ.

Панасенко и соавт. исследовано влияние производных 3-оксипиридина на активность дыхательной цепи митохондрий и установлено, что чем выше коэффициент распределения R для производных 3-оксипиридина в системе октанол — вода, т. е. чем выше гидрофобность этих веществ, тем они эффективнее ингибируют НАД-Н-оксидазу [39]. В наших экспериментах подобная корреляция отсутствует, однако из данных таблицы видно, что полярные заместители снижают эффективность производных 3-оксипиридина как ингибиторов ФДЭ.

С другой стороны, показано, что и при наличии полярных заместителей в составе молекулы пиридина (карбокисильных или амидных) наблюдается выраженное ингибирование ФДЭ-II [22].

При изучении механизма бактериостатического действия 3-оксипиридинон показано, что они являются специфическими ингибиторами клеточного деле-

ния, избирательно блокируя системы, ответственные за синтез и эффекты инозита и пантотеновой кислоты [40]. В то же время известно, что цАМФ также тормозит деление клеток [41]. Следовательно, ингибирование ФДЭ циклических нуклеотидов 3-оксипиридинами может служить объяснением этому физиологическому эффекту.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурлакова Е. Б., Алексенко А. В., Молочкина Е. М. и др. — Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., 1975, с. 71—73.
- Шумаков В. И., Цылин А. Б., Куркина Р. М. и др. — Кровообращение, 1977, № 2, с. 55—57.
- Emanuel N. M. — Quart. Rev. Biophys., 1976, v. 9, p. 283—308.
- Эмануэль Н. М., Обухова Л. К., Смирнов Л. Д. и др. — Докл. АН СССР, 1976, т. 226, № 4, с. 961.
- Philippe Jean (Ferlux) — Пат. ФРГ, 2205194 (1972) — Chem. Abstr., 1972, v. 7, p. 15194e.
- Stempel A., Aeschmann J. A. — J. Am. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 3323—3326.
- Shimamoto T., Ischiyama M., Inoe M. et al. — Пат. Японии, 7001, 185 (1970) — Chem. Abstr., 1971, v. 74, p. 53553S.
- Kawazu M., Seto M., Watanabe M. Пат. Японии, 7102, 091 (1971). — Chem. Abstr., 1971, v. 74, p. 99885e.
- Blanz E., French F. A. — Cancer Res., 1968, v. 28, p. 2419.
- Skidmore I. F., Schonhofer P. S., Kritchinsky D. — Pharmacology, 1971, v. 6, p. 330—338.
- Shimoyama M., Kawai M., Hoshi Y. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, p. 1137—1141.
- Бурлакова Е. Б., Эмануэль Н. М. — Докл. АН СССР, 1960 т. 135, № 3, с. 599—602.
- Эмануэль Н. М., Круглякова К. Е., Захарова Н. А. и др. — Там же, 1960, т. 131, № 6, с. 1451—1453.
- Круглякова К. Е., Николаева Н. В., Захарова Н. А. и др. — Там же, 1964, т. 157, № 4, с. 979—981.
- Захарова Н. А., Кузьмин В. И., Круглякова К. Е. и др. — Изв. АН СССР, Серия хим., 1977, № 5, с. 1013—1016.
- Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г., Штолько В. Н. и др. — Докл. АН СССР, 1966, т. 169, № 3, с. 688—691.
- Samuelsson B. — Tends Pharmacol. Sci., 1980, v. 1, p. 227—230.
- Monkada S., Vane J. R. — Pharmacol. Rev., 1979, v. 30, p. 293—322.
- Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в жидкой клетке. М., 1980, т. 2, с. 553.
- Dewhirst F. E. — Prostaglandins, 1980, v. 20, p. 209—222.
- Шуляковская Т. С., Аришнов В. Ю., Панасенко В. Ю. и др. — Докл. АН СССР, 1980, т. 254, № 1, с. 242—245.
- Samir Amer M., Kreighbaum W. E. — J. pharm. Sci., 1975, v. 64, p. 1—37.
- Ткачук В. А., Лазаревич В. Г., Меньшиков М. Ю. и др. — Биохимия, 1978, т. 43, № 9, с. 1622—1629.
- Лазаревич В. Г., Ткачук В. А. — Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 2, с. 492—494.
- Urbanski T. — J. Chem. Soc., 1946, p. 1104.
- Urbanski T. — Ibid., 1947, p. 132.
- Heinert D., Martell A. E. — Tetrahedron, 1958, v. 3, p. 49—61.
- Смирнов Л. Д., Лезина В. П., Быстров В. Ф. и др. — Изв. АН СССР, Серия хим., 1965, № 10, с. 1836—1844.
- Смирнов Л. Д., Шолгина С. И., Круглякова К. Е. и др. — Там же, 1963, № 5, с. 890—892.
- Смирнов Л. Д. — Изв. Сибир. орг. АН СССР, Серия хим., 1981, вып. 1, № 2, с. 68—80.
- Lowry D. H., Rosenbrough N. J. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
- Hardman J. G., Sutherland E. W. — Ibid., 1965, v. 240, p. 3704—3705.
- Brooker G., Thomas L., Appleman M. M. — Biochemistry (Wash.), 1968, v. 7, p. 4177—4181.
- van Inwegen R. G., Pledger W. J., Strada S. J. et al. — Arch. Biochem., 1976, v. 176, p. 700—709.
- Gardner E. A., Thompson W. — J. Biochem., 1978, v. 17, p. 2995—3000.
- Endress R. — Phytochemistry, 1979, v. 18, p. 15—20.
- Yamazaki A., Sen I., Bitensky M. W. — J. biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11619—11624.
- Schroeder J. — Biochim. biophys. Acta, 1974, v. 343, p. 173—181.
- Панасенко О. М., Гендель Л. Я., Круглякова К. Е. и др. — Изв. АН СССР, Серия биол., 1981, № 4, с. 607—610.
- Одицкова Е. Н. — Докл. АН СССР, 1967, т. 176, с. 717—718.
- Cho-Chung Y. S. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 3492—3496.

Поступила 17.04.82

INHIBITION OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE FROM RABBIT HEART BY HYDROXYPYRIDINES

N. B. Polyansky, L. D. Smirnov, A. A. Shvedova, V. E. Kagan, V. A. Tkachuk

M. V. Lomonosov State University, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

3-Hydroxypyridines, which are inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase, affected reversibly and non-competitively the enzyme molecule as compared with cAMP. A number of substances was found exhibiting high inhibitory and antioxidant activities, high inhibitory and low antioxidant activities, as well as low inhibitory and high antioxidant activities. Elucidation of the 3-hydroxypyridines action via antioxidant or phosphodiesterase pathways became possible.