



УДК 577.175.859:615.276.015

ПРОСТАГЛАНДИНОПОДОБНЫЕ ИНГИБИТОРЫ
ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ

Мевх А.Т., Игумнова Н.Д., Муратов В.К.*,
Фрейманис Я.Ф.**, Кориц В.Ф.**, Варфоломеев С.Д.*

*Московский государственный университет, Межфакультетская
проблемная научно-исследовательская лаборатория им. А. Н. Белозерского;*

** I Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова;
** Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Изучено влияние девяти простагландиноподобных веществ — производных циклопентанона на активность простагландин-Н-синтазы. Показано, что семь из них — ингибиторы фермента. Установлены механизмы ингибирования простагландин-Н-синтазы производными циклопентанона. Определены кинетические и равновесные характеристики ингибирования фермента. Среди исследуемых веществ выделены соединения, по ингибирующей активности сопоставимые с известными нестероидными противовоспалительными лекарственными препаратами.

Известно, что многие субстратоподобные вещества — ингибиторы соответствующих ферментов, в том числе ферментов синтеза простаноидов [1—4]. Простагландин-Н-синтаза (PGH-синтаза) (КФ.1.14.99.1) — ключевой фермент синтеза высокоактивных соединений — простаноидов [5], уровень которых в организме человека и животных увеличивается при многих патологических состояниях, например при воспалительных процессах [6, 7], сердечно-сосудистых заболеваниях [8], при псориазе [9].

Наиболее изученные ингибиторы PGH-синтазы — широко применяемые нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты (НПВП) (такие, как аспирин, бруфен, апальгин и т. п.) [10—18]. Для них определены кинетические параметры и установлены механизмы взаимодействия ингибиторов с ферментом [16—18], проведено сравнение ингибирующей способности некоторых исследованных НПВП по отношению к PGH-синтазе из различных источников (везикулярные железы барана и тромбоциты человека) [13, 17]. В настоящей работе изучено взаимодействие ряда производных циклопентанона (соединения (I) — (IX), таблица) — соединений, структурно близких к простаноидам, — на активность PGH-синтазы с целью поиска новых ингибиторов фермента и выявления механизмов их действия.

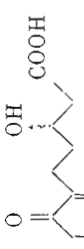


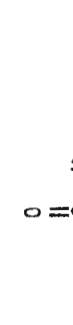

В качестве ферментного препарата использовали солиобилизированные микросомы везикулярных желез барана, очищенные на DEAE-целлюлозе [25]. Предварительно было показано, что выбранный ферментный препарат по каталитическим свойствам не имеет принципиальных отличий от гомогенного фермента [26].

Каждое из соединений (I) — (IX) инкубировали с PGH-синтазой и следили за изменением ферментативной активности во времени (рис. 1). Вещества (I) и (II) в концентрациях 0,5—9 мМ понижали активность PGH-синтазы, причем степень ингибирования фермента не зависела от времени его инкубации с веществом (рис. 1а). Из этого следует, что вещества (I) и (II) — быстрые обратимые ингибиторы PGH-синтазы.

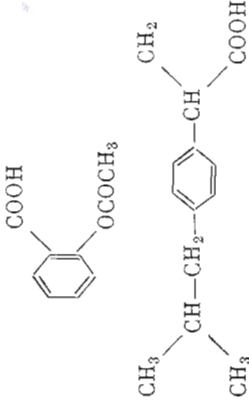
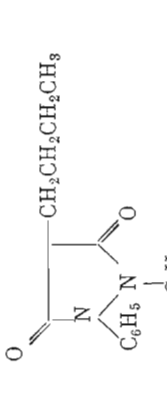
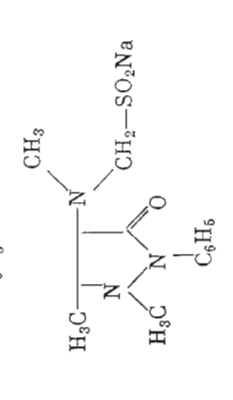

Результаты зависимости ферментативной активности от концентрации арахидоновой кислоты при различных постоянных концентрациях соединений (I) и (II) свидетельствуют, что они являются конкурентными ин-

Сокращения: PGH — простагландин Н, НПВП — нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты.

Влияние производных циклопентана на простагландин-Н-синтазную активность

Шифр	Название вещества	Структурная формула	Диапазон исследованных концентраций, мМ	Кинетические и равновесные характеристики ингибирования	Механизмы ингибирования
I	2-(4-Карбокси-3-гидроксибутил)-2-циклопентен-1-он [19]		0,55–2,8	$K_1 = (7,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-3} \text{ M}$	Быстрый обратимый конкурентный ингибитор
II	2-(4-Карбоксибутил)-2-циклопентен-1-он [19]		1,3–5,5	$K_1 = (4,45 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ M}$	То же
III	2-(6-Амидогексил)-2-циклопентен-1-он [20]		0,6–3,3	Не ингибирует	—
IV	2-Карбоксиметил-3-(транс-3'-гидрокси-1'-октенил)-4-бутилциклопентан-1-он, 3'α-изомер [21]		0,88–2,3	$k_1 = (0,22 \pm 0,04) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,67 \pm 0,32) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ $K_1 = (7,7 \pm 1,5) \cdot 10^{-5} \text{ M}$	Медленный обратимый ингибитор
V	2-Карбоксиметил-3-бутил-4-(транс-3'-гидрокси-1'-октенил)циклопентан-1-он, 3'β-изомер [22]		0,55–1,8	$k_1 = (0,29 \pm 0,06) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,25 \pm 0,25) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ $K_1 = (4,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-5} \text{ M}$	То же

Шифр	Название вещества	Структурная формула	Диапазон исследованных концентраций, мм	Кинетические и равновесные характеристики ингибирования	Механизмы ингибирования
VI	2-Карбоксиметил-3-октил-4-(<i>транс</i> -3'-гидрокси-1'-октенил)циклопентан-1-он, 3'α-изомер [22]		0,24–0,95	$k_1 = (0,48 \pm 0,09) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,67 \pm 0,35) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ $K_1 = (3,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-5} \text{ M}$	»
VII	2-Карбоксиметил-3-октил-4-(<i>транс</i> -3'-гидрокси-1'-октенил)циклопентан-1-он, 3'β-изомер [22]		0,14–0,55	$k_1 = (0,83 \pm 0,2) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ $K_1 = (1,8 \pm 0,45) \cdot 10^{-5} \text{ M}$	»
VIII	2-Карбоксиметил-3-(<i>транс</i> -3'-гидрокси-1'-октенил)-4-(<i>транс</i> -3"-гидрокси-1"-октенил)циклопропан-1-он, 3'α, 3"α-изомер [23]		1,75–3,45	$k_1 = (0,088 \pm 0,025) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (2,08 \pm 0,4) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ $K_1 = (2,38 \pm 0,68) \cdot 10^{-3} \text{ M}$	»
IX	2-[3-Карбоксипропил)-оксикарбонилметил]-3-(<i>транс</i> -3'-гидрокси-1'-октенил)-4-гидроксициклопентан-1-он, 3'α-изомер [24]		0,68–4,1	Не ингибирует	

Шифр	Название вещества	Структурная формула	Диапазон исследованных концентраций, мм	Кинетические и равновесные характеристики ингибирования	Механизмы ингибирования
Аспирин			0,5-4,4	$k = 0,17 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Медленный необратимый ингибитор [13]
Бруфен			0,008-0,13	$K_1 = (1 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ M}$	Быстрый обратимый конкурентный ингибитор [14]
Бутадион			0,62-4,2	$K_1 = (3,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-4} \text{ M}$	То же [15]
Анальгин			0,29-4,8	$K_1 = (9,8 \pm 2,2) \cdot 10^{-4} \text{ M}$	»

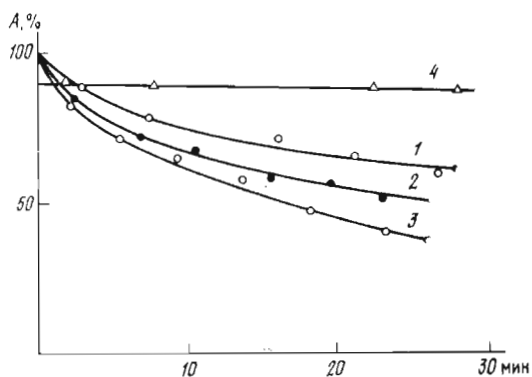


Рис. 1

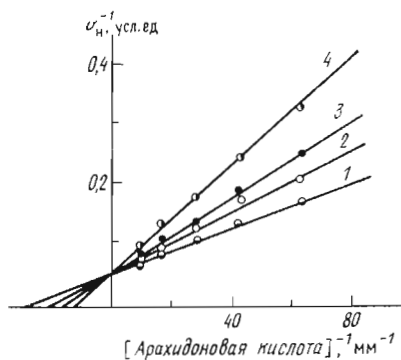


Рис. 2

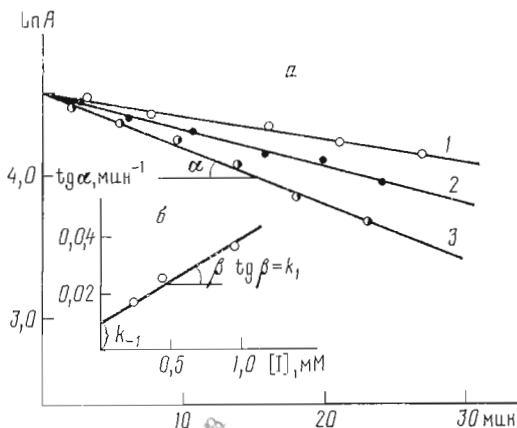


Рис. 3

Рис. 1. Кинетические кривые изменения активности РGH-синтазы при инкубации фермента в присутствии 0,92 мМ ингибитора (I) (4) и ингибитора (VI) в концентрации 0,24 (1), 0,47 (2) и 0,95 мМ (3)

Рис. 2. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции (v_n) от концентрации арахидоновой кислоты в обратных координатах в отсутствие ингибитора (1) и при наличии 1,38 (2), 3,48 (3) и 5,5 мМ (4) соединения (II)

Рис. 3. Определение кинетических параметров ингибирования РGH-синтазы соединением (VI): а — линейризация данных рис. 1 в полулогарифмических координатах (номера кривых как на рис. 1); б — зависимость наблюдаемой константы скорости ингибирования первого порядка от концентрации соединения (VI)

гибиторами фермента по отношению к арахидоновой кислоте (рис. 2). Константы ингибирования, рассчитанные из этих экспериментальных данных (таблица), говорят о том, что соединения (I) и (II) — слабые обратимые конкурентные ингибиторы РGH-синтазы, значительно уступающие по активности бруфену, напроксену и анальгину (в 10–50 раз) [14, 15]. Введение в боковую цепь соединения (II) гидроксильной группы, т. е. превращение его в соединение (I), ослабляет ингибирующую активность приблизительно в 2 раза. Изменение карбоксильной группы на амидную с одновременным удлинением углеводородной цепи (соединение (III)) приводит к полной утрате ингибирующей активности. Препарат (III) в концентрациях до 3,3 мМ не оказывал никакого влияния на активность РGH-синтазы. По-видимому, для простагландиноподобных производных циклопентанона, как и для известных НПВП (салицилатов, индометацина, бруфена, вольтарена и др.) [13, 15–18], наличие свободной карбоксильной группы в молекуле — одно из необходимых условий для проявления ингибирующей активности в отношении РGH-синтазы.

Инкубация РGH-синтазы с соединениями (IV)–(VIII) приводила к медленной потере ферментативной активности (рис. 1). Соединения

(IV)–(VIII) по типу ингибирования соответствуют (рис. 3) медленным обратимым ингибиторам. Об обратном характере их действия свидетельствует также то, что при разбавлении инкубационной смеси фермента с препаратами в 20–30 раз активность фермента возвращалась к первоначальной. Константы ингибирования, определенные как показано на рис. 3а и б для соединения (VI), приведены в таблице.

Ингибирующая активность исследованных веществ увеличивается в ряду (VIII) < (IV) < (V) < (VI) < (VII) и для соединений (VI) и (VII) сопоставима с активностью анальгина и бутадiona, а для остальных ингибиторов — с активностью аспирина.

Для химической структуры наиболее активных соединений (VI) и (VII) характерно наличие двух гидрофобных боковых цепей C_8H_{17} , в одной из которых имеется гидроксильная группа в α - или β -положении (таблица). Соединение (VII), являющееся β -изомером, оказалось приблизительно в 2 раза более активным, чем α -изомер (VI). Введение дополнительной гидроксильной группы во вторую боковую цепь (соединение (VIII)) снижало его активность почти в 10 раз. Уменьшение длины одной из боковых цепей до C_4H_9 (соединения (V) и (IV)) также снижало ингибирующую активность. Соединение (IX) в концентрации до 4 мМ не ингибировало фермент. Однозначное объяснение этого результата на основании сопоставления структуры обследованных соединений не представляется возможным из-за множественности структурных модификаций.

Таким образом, среди изученных производных циклопентанона нами выявлены соединения ((I), (II), (IV)–(VIII)), являющиеся ингибиторами PGH-синтазы. Соединения (VI) и (VII) по ингибирующей активности сопоставимы с широко используемыми в медицинской практике НПВП.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института органического синтеза АН ЛатвССР Э. В. Лоте, И. А. Милману и Г. П. Соколову, любезно предоставившим для работы некоторые соединения.

Экспериментальная часть

Исследовано 9 производных циклопентанона. Структурные формулы, названия и ссылки на методики синтеза этих соединений приведены в таблице.

Удельная активность использованного фермента [25] составляла $1,75 \cdot 10^{-6}$ моль адреналина/мин·мл.

Ферментативная активность PGH-синтазы определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония) при 480 нм [25] в реакционной смеси объемом 2 мл, содержащей белок, 0,1 мМ арахидоновую кислоту, 1 мМ адреналин и 2 мкМ гемин, как начальную скорость на кривой накопления адrenoхрома при 25° С.

0,2 мл PGH-синтазы инкубировали при 25° С в 15 мл 50 мМ трис-HCl-буфера, рН 7,8, с соединениями (I)–(IX) в концентрациях 0,14–9 мМ в присутствии 0,1% твина-20 и отбирали во времени аликвоты по 2 мл для определения активности. Исходные концентрации ингибиторов в спирте 100–400 мМ. Концентрации спирта в среде инкубации не превышали 1,6% и не оказывали влияния на активность фермента [14]. Предварительно было установлено, что исследуемые вещества не влияют на спектральную характеристику ферментативной реакции при данной длине волны. Обработка экспериментальных данных по влиянию производных циклопентанона на кинетику ферментативной реакции проведена как описано в [13, 16].

Влияние веществ (I) и (II) на начальную скорость ферментативной реакции при различных концентрациях арахидоновой кислоты (0,011–0,11 мМ) определяли как описано в работе [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hammarström S. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 487. № 3. p. 517–519.
2. Siegel M. I., Meconnell R. T., Abrahams S. L., Porter N. A., Quatre Casas P. // Biochim. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 89. № 4. P. 1273–1280.

3. *Wilheim T., Sankarappa S. K., Van Rollins M., Sprecher H.* // Prostaglandins. 1981. V. 21. № 2. P. 323-332.
4. *White H. L., Glassman A. T.* // Prostaglandins. 1976. V. 12. № 5. P. 811-828.
5. *Miyamoto T., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O.* // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 2629-2636.
6. *Vane J. R.* // Nature. 1971. V. 231. P. 232-235.
7. *Kuehl F. A.* // Science. 1980. V. 210. P. 978-984.
8. *Зыкова В. П., Афонин И. П., Задоля А. А.* // Кардиология. 1976. № 2. С. 68-73.
9. *Hammarstrom S., Hamberh M., Samuelsson B., Duell E. A., Stawiski M., Woorhes J. J.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 2. P. 5130-5134.
10. *Mocada S., Vane J. R.* // Advans. Intern. Med. 1979. V. 24. P. 1-22.
11. *Vane J. R.* // Int. J. Tissue React. 1987. V. 9. № 1. P. 1-14.
12. *Nouv. - Quest.*, 1986. fevr. № 3. P. 59-65.
13. *Муратов В. К., Игумнова Н. Д., Басевич В. В., Чурыканов В. В., Мевх А. Т.* // Фармакол. и токсикол., 1983. № 5. С. 44-48.
14. *Муратов В. К., Варфоломеев С. Д., Игумнова Н. Д., Мевх А. Т., Чурыканов В. В.* // Фармакол. и токсикол., 1984. № 1. С. 71-74.
15. *Муратов В. К., Варфоломеев С. Д., Игумнова Н. Д., Мевх А. Т., Чурыканов В. В.* // Фармакол. и токсикол., 1984. № 5. С. 41-44.
16. *Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т.* Простагландины - молекулярные биорегуляторы: биокинетика, биохимия, медицина. М.: МГУ, 1985.
17. *Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т., Муратов В. К., Игумнова Н. Д., Чурыканов В. В.* // Молекулярные основы действия ферментов. М.: МГУ, 1985. С. 3-27.
18. *Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т.* // Биоорганическая химия (Итоги науки и техн.). ВИНТИ. 1986. Т. 9. С. 1-152.
19. *Фрейманис Я. Ф., Милман И. А., Матъсова Г. Р., Лиепиньш Э. Э.* // Журн. орг. химии. 1988. Т. XXIV. Вып. 9. С. 1881-1888.
20. *Мышнев А. Ф., Милман И. А., Блейделис Я. Я., Фрейманис Я. Ф., Дипан И. В., Кузьмина Г. Р.* // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1985. № 4. С. 493-496.
21. *Кориц В. Р., Розите С. Х., Фрейманис Я. Ф., Соколов Г. П.* // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1987. № 6. С. 731-739.
22. *Силиньш А. О., Кориц В. Р., Розите С. Х., Туровский И. В., Соколов Г. П., Фрейманис Я. Ф.* // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1988. № 4. С. 471-477.
23. *Кориц В. Р., Розите С. Х., Сахатова О. В., Диковская К. П., Туровский И. В., Фрейманис Я. Ф.* // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1989. № 4. С. 483-489.
24. *Ложа Э. В., Лоля Д. О., Фрейманис Я. Ф.* // Тез. докл. IV Всесоюз. конф. по металлоорганической химии. Казань, 1988. С. 52.
25. *Мевх А. Т., Вржещ П. В., Басевич В. В., Варфоломеев С. Д.* // Химическая и биологическая кинетика. М.: МГУ, 1983. С. 224-292.
26. *Mevkh A. T., Sud'ina G. F., Golub N. B., Varfolomeev S. D.* // Anal. Biochem. 1985. V. 150. № 1. P. 91-95.

Поступила в редакцию

1.II.1989

После доработки

20.IV.1989

PROSTAGLANDIN-LIKE INHIBITORS OF THE PROSTAGLANDIN H SYNTHASE

MEVKH A. T., IGUMNOVA N. D.*, MURATOV V. K.*, FREIMANIS Y. F.**,
KORITZ V. F.***, VARFOLOMEEV S. D.

Moscow State University, A. N. Belozersky Laboratory,

* First Moscow Medical Institute, Moscow,

** Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

The effect of none prostaglandin-like cyclopentanone derivatives on the prostaglandin H synthase activity was studied. Seven substances proved to be inhibitors of the enzyme, some of the being similar to the well-known nonsteroid antiinflammatory drugs with respect to their inhibitory activity.