

**Пятакова Наталья Владимировна**

**Регуляция активности растворимой гуанилатциклазы**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАМН)

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор,  
**Северина Ирина Сергеевна**

**Официальные  
оппоненты:** **Прозоровский Владимир Николаевич**  
доктор биологических наук, ФГБУ «ИБМХ» РАМН,  
главный научный сотрудник

**Реутов Валентин Палладиевич**  
доктор биологических наук, ФГБУН Институт высшей  
нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ведущий  
научный сотрудник

**Ведущее учреждение** Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Российский университет дружбы народов», медицинский  
факультет

Защита состоится «13» декабря 2012г. в 12:30 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01. при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Эндогенный оксид азота (NO) оказавшийся эндотелиальным фактором релаксации (ЭДФР), является одним из основных сосудорасширяющих факторов, регулирующих деятельность сердечно-сосудистой системы. Он образуется из L-аргинина под действием L-аргинин-NO-синтазы (Palmer et al., 1988). Оксид азота участвует во многих жизненно важных процессах; он является мощным фактором гемостаза, ингибирует агрегацию тромбоцитов и рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилататор (Ignarro et al., 2002).

Основным внутриклеточным рецептором оксида азота является растворимая гуанилатциклаза (Poulus, 2006), катализирующая биосинтез циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ – мощный регулятор метаболизма клетки в значительной степени определяющий ее функции (Hoffmann et al., 2006). Большинство физиологических эффектов оксида азота (в том числе антигипертензивный и антиагрегантный) осуществляется через стимуляцию растворимой гуанилатциклазы и накопление цГМФ (Bellamy et al., 2002). Важная роль внутриклеточной сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза – цГМФ в регуляции функции клетки и нарушение активности этой системы при многих патологических состояниях (гипертония, астма, сепсис и др.) требует создания препаратов, которые направлены бы регулировали активность этой системы и таким образом устраняли бы возникшие нарушения

Наиболее известными лекарственными препаратами, которые используются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с недостатком образования эндогенного NO – являются органические нитраты (нитроглицерин и др.). Несмотря на большое количество уже существующих нитровазодилататоров поиск новых NO-доноров продолжается. Это обусловлено возникновением нежелательных побочных эффектов при их длительном применении (в том числе развитие толерантности) и потому необходимостью создания более эффективных и менее токсичных препаратов. При патологических состояниях, связанных с избытком образования эндогенного NO в организме (астма, сепсис, септический шок) наблюдается другая картина. Соединений, способных ингибировать NO-зависимую активацию гуанилатциклазы пока единицы и все они токсичны, а подобные лекарственные препараты – просто отсутствуют.

**Цель исследования.** Изучение механизмов направленной регуляции растворимой гуанилатциклазы новыми активаторами и ингибиторами фермента.

### **Задачи исследования.**

1. Выявить в качестве активаторов растворимой гуанилатциклазы новые потенциальные доноры оксида азота, относящиеся к различным классам химических соединений:

- производные N-нитропиразола
- производные бензатетразин -1,3-диоксида
- бензодифуроксан
- производные фуроксана, конденсированные с пиридазин-ди-N-оксидным циклом

2. Изучить способность соединений генерировать оксид азота, активировать растворимую гуанилатциклазу и ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

3. Выявить и исследовать в качестве ингибиторов NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы новые соединения, в том числе некоторые лекарственные препараты:

- карнозин – эндогенный дипептид ( $\beta$ -аланил-L-гистидин)
- амброксол – муколитический препарат
- артемизинин – антималярийный препарат

**Научная новизна.** В ходе выполнения работы впервые:

– показана способность новых доноров оксида азота активировать растворимую гуанилатциклазу и ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов с эффективностью пропорциональной степени активации фермента; т.е. на основании величины стимулирующего эффекта соединений могла прогнозироваться фармакологическая активность новых доноров NO (гипотензивный и антиагрегантный эффекты);

– показано, что карнозин - эндогенный дипептид ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) является селективным ингибитором NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы;

– установлено, что амброксол – муколитический препарат, ингибирует активацию растворимой гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и легких крысы NO-донорами, а артемизинин – антималярийное средство, тормозит NO-зависимую активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека в пределах его терапевтических концентраций.

Оба лекарственных препарата не влияют на активацию фермента протопорфирином IX;

– сделано заключение о вовлечении сигнальной системы NO – растворимая гуанилатциклаза – цГМФ в механизм терапевтического действия амброксола и

артемизинина, что расширяет представление о физиологической значимости этой сигнальной системы.

**Научно-практическая значимость исследования.** На основании анализа полученных данных по исследованию новых доноров оксида азота были сформулированы молекулярные основы для направленного поиска и создания новых эффективных вазодилататоров и антиагрегантов. Выявлены соединения, оказавшиеся мощными ингибиторами АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов: 3,5-диметил-N-нитропиразол с величиной  $IC_{50}$  равной  $7 \cdot 10^{-9}$  М и бензодифуроксан с  $IC_{50}$   $6 \cdot 10^{-8}$  М. Отличительной чертой этих антиагрегантов является их способность не только снижать гиперагрегацию тромбоцитов, но и предупреждать (или устранять) спонтанную агрегацию, а, следовательно, предупреждать возникновение и развитие сосудистых осложнений.

Выявленная способность карнозина – эндогенного дипептида – селективным образом ингибировать NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы позволяет предложить это соединение в качестве лекарственного средства для лечения патологических состояний, связанных с избытком генерирования эндогенного NO. Следует подчеркнуть, что карнозин не токсичен, полностью метаболизируется, не накапливается в организме человека при длительном использовании. Известно, что карнозин уже используется в качестве лекарственного средства в офтальмологии.

Представленные результаты о торможении амброксолом NO-зависимой активации гуанилатциклазы впервые указывают на возможность создания новых более эффективных муколитических средств на основе ингибиторов NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы. Преимуществом такого подхода является снижение только избыточного образования эндогенного NO и при этом не подавляется его синтез, который необходим для регуляции нормальных физиологических функций дыхательного тракта.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были доложены: на Международной научной конференции «Сигнальные нейропептиды и конформация макромолекул» (г.Москва, 2000), на Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г.Москва 2000, 2003), на 3<sup>ем</sup> Международном биохимическом конгрессе (г. Санкт-Петербург, 2002), на Всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии» (г.Москва, 2002), на научных конференциях и межлабораторных семинарах Научно-исследовательского института биомедицинской химии им.В.Н.Ореховича РАМН (г.Москва, 2001, 2003, 2010, 2011,2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 научных статей в периодических изданиях, включенных в перечень ВАК, получен патент РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 118 страницах, иллюстрирована 18 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 177 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования.** В качестве источника растворимой гуанилатциклазы использовали: тромбоциты человека, выделенные из крови здоровых доноров и легкие крыс.

**Выделение тромбоцитов из крови человека.** Тромбоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров. В качестве антикоагулянта использовали 3,8% раствор трехзамещенного цитрата натрия в соотношении с кровью по объему 1:9.

Кровь центрифугировали 7 мин. при 450g. Обогащенную тромбоцитами плазму (4мл) наслаивали на Ficoll-Paque (2мл) и центрифугировали 25 мин при 650g. Концентрат тромбоцитов (на границе раздела фаз) отбирали, суспендировали в равном объеме, 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащего 0,9% NaCl, 5 мМ ЭДТА и центрифугировали 15 мин при 1000g. Для окончательного удаления Ficoll-Paque и белков плазмы осажденные тромбоциты ресуспендировали в 1 мл этого же буфера и центрифугировали 10 мин. при 750g. Полученный осадок тромбоцитов ресуспендировали в 1 мл 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащего 0,2 мМ дитиотрейтола.

**Получение препарата растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека.** Суспензию отмытых тромбоцитов озвучивали при 4<sup>0</sup>C на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Великобритания) в течение 20 секунд при амплитуде 16 мкм. В результате происходило разрушение мембран тромбоцитов и выход цитозольного содержимого тромбоцитов в раствор.

Разрушенные тромбоциты центрифугировали в течение 1 часа при 105000g (при 4<sup>0</sup>C) на ультрацентрифуге Beckman Optima LE 90-K. Супернатант 105000g использовали в качестве ферментного препарата растворимой гуанилатциклазы. Белок определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

**Получение препарата растворимой гуанилатциклазы легких крысы.** Крыс

убивали декапитацией. Полученные легкие промывали 0,9% NaCl, измельчали ножницами и готовили 10% гомогенат. Гомогенизировали ткань в 50 mM трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащем 0,5 mM ДТТ. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 1 часа при 105000g на ультрацентрифуге Beckman Optima LE 90-K. Надосадочную жидкость использовали в качестве препарата растворимой гуанилатциклазы.

**Определение активности гуанилатциклазы.** Определение активности гуанилатциклазы проводили согласно (Garbers D., Murad F., 1979).

Реакционная смесь (общий объем 150 мкл) содержала 50 mM трис-HCl буфер (pH 7,6), 1 mM ГТФ, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 mM теofilлин, 15 - 20 мкг белка тромбоцитов человека или 50 мкг легких крысы (супернатант 105000g) и другие добавки при необходимости.

Гуанилатциклазную реакцию проводили при 37<sup>0</sup>C в водяном термостате в течение 15 мин. Реакцию останавливали нагреванием проб в водяной бане в течение 2 мин. при 90<sup>0</sup>C. Затем пробы охлаждали во льду и центрифугировали в течение 10 минут при 1000g. В полученном супернатанте определяли содержание образовавшегося цГМФ методом иммуноферментного анализа. Активность гуанилатциклазы выражали в пмоль ферментативно образовавшегося цГМФ за 1 минуту инкубации при 37<sup>0</sup>C на 1 мг белка ферментного препарата.

**Проведение агрегации тромбоцитов.** Для получения тромбоцитов использовали венозную кровь здоровых доноров. В качестве антикоагулянта использовали 3,8% раствор трехзамещенного цитрата натрия в соотношении с кровью 1:9 по объему. Кровь центрифугировали 7 минут при 450g и отбирали богатую тромбоцитами плазму. При необходимости исходную концентрацию тромбоцитов в плазме разбавляли безтромбоцитарной плазмой, до содержания тромбоцитов  $2,5 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл плазмы.

Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна, который основывается на изменении пропускания света (540 нм) через исследуемую плазму при ее постоянном перемешивании (1000 об/мин) при 37<sup>0</sup>C. Степень светопропускания через безтромбоцитарную плазму принимали за 100%-ную агрегацию тромбоцитов (Чирков Ю.Ю. с соавт., 1991).

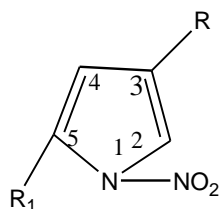
В качестве индуктора агрегации использовали раствор АДФ в конечной концентрации от 0,5 до 10,0 мкМ в 120 mM растворе NaCl. Получаемые агрегограммы представляют собой зависимость степени агрегации от времени, прошедшего после добавления индуктора агрегации.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты экспериментов обрабатывали статистически. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Новые доноры оксида азота (NO) - активаторы гуанилатциклазы и ингибиторы агрегации тромбоцитов.

**N-Нитропиразолы.** N-Нитропиразолы с общей формулой:



где R и R<sub>1</sub> – H или CH<sub>3</sub>,

также как и нитроэфиры, оказывают антигипертензивное действие благодаря разрыву связи N-NO<sub>2</sub> и генерированию NO. Ценность этих соединений обусловлена возможностью направленного изменения донорно-акцепторных свойств связи N-NO<sub>2</sub> за счет природы заместителей в пиразольном кольце. Исследованные соединения представлены в табл. 1.

По легкости и интенсивности образования NO соединения можно было разделить на 2 группы. В одной – соединения 1 – 3, у которых генерирование NO было невелико (порядка 1 - 3%), в другой – соединение 4 характеризующееся значительным (до 40%) образованием оксида азота. В полном соответствии с этими результатами находятся и полученные нами данные по влиянию соединений на активность гуанилатциклазы (табл.1).

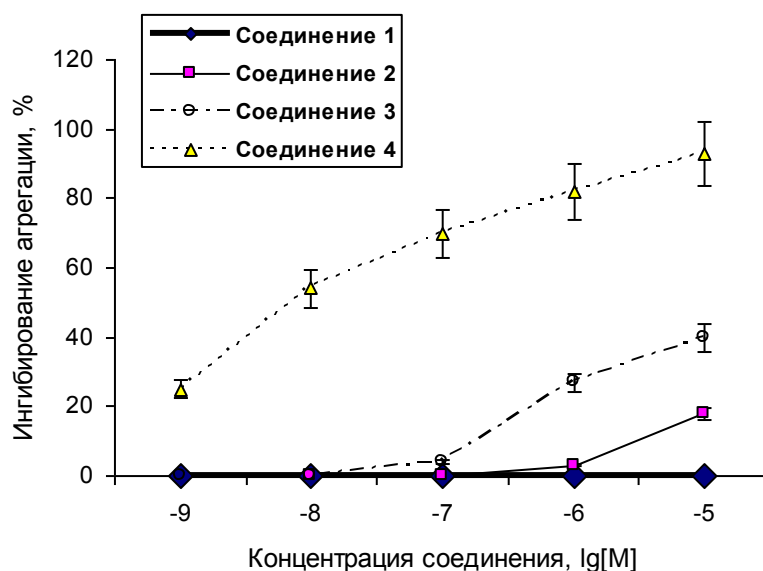
**Таблица 1.** Влияние производных N-нитропиразолов на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека.

№ соедине ний	Название	Химическая формула	Степень активации гуанилатциклазы			
			Концентрация соединений (M)			
			10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	1-нитропиразол		1,00±0,02	1,00±0,03	1,00±0,05	0,95±0,02
2	1-нитро-3-метилпиразол		1,00±0,03	1,10±0,03	1,31±0,04	0,91±0,02
3	1-нитро-5-метилпиразол		1,00±0,03	1,20±0,03	1,73±0,04	0,98±0,02
4	1-нитро-3,5- диметилпиразол		1,13±0,02	1,75±0,06	4,03±0,01	4,26±0,02

**Примечание.** Базальная удельная активность составила 124±12 пмоль цГМФ в минуту на 1 мг белка. Приведены средние величины из 8 независимых экспериментов.



Наиболее активным донором NO и активатором гуанилатциклазы оказалось соединение 4 (3,5-диметил-N-нитропиразол) (табл.1). Легкость разрыва связи определялась стабильностью пиразольного радикала (Pz). Интересно, что согласно результатам квантово-механических расчетов, наиболее стабильным оказался именно 3,5-диметилпиразольный радикал.



**Рисунок 1. Зависимость ингибирования АДФ- индуцированной агрегации тромбоцитов человека от концентрации N-нитропиразолов.** Приведены средние значения из 5 независимых экспериментов.

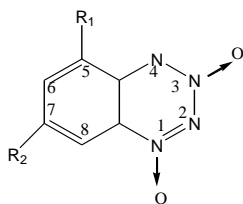
На рис.1 представлены результаты по предотвращению АДФ- индуцированной агрегации тромбоцитов соединениями 1-4.

Наиболее эффективным оказалось соединение 4 (3,5-диметил-N- нитропиразол), ингибирующее агрегацию с величиной  $IC_{50}$  равной  $7 \cdot 10^{-9}$  М (рис.1). Следует отметить, что 3,5-диметил-N- нитропиразол обладал и наиболее выраженным спазмолитическим свойством.

Таким образом, исследованные новые производные N-нитропиразолов генерировали оксид азота, активировали растворимую гуанилатциклазу и ингибировали агрегацию тромбоцитов, с интенсивностью пропорциональной степени активации фермента.

**Производные бензотетразин-1,3-диоксида.** Следующие новые доноры оксида азота и активаторы растворимой гуанилатциклазы были выявлены нами при исследовании производных бензотетразин-1,3-диоксида (ранее не исследованного

нового класса возможных потенциальных доноров NO), общей формулой



Были исследованы следующие нитрозамещенные бензотетразин-1,3-диоксиды:

5-нитробензотетразин-диоксид ( $R_1 = \text{NO}_2$ ,  $R_2 = \text{H}$ ) (5-НБТДО),

7-нитробензотетразин-диоксид ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{NO}_2$ ) (7-НБТДО) и

5,7-динитробензотетразин-диоксид ( $R_1 = R_2 = \text{NO}_2$ ) (5,7-ДНБТДО).

Впервые показано, что исследованные бензотетразин-1,3-диоксиды являются тиолзависимыми донорами оксида азота. Наиболее эффективным донором NO оказался 7- нитробензотетразин-диоксид ( $5,8 \pm 4\%$  от теоретически возможного), 5-НБТДО и 5,7-ДНБТДО генерировали NO в меньших количествах  $1,0 \pm 2$  и  $1,4 \pm 3\%$ , соответственно.

NO-донорные свойства использованных бензотетразин-диоксидов предопределили и их способность активировать растворимую гуанилатциклазу (табл.2).

**Таблица 2.** Влияние глутатиона (100 мкМ) на активацию растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека 5-НБТДО 10 мкМ, 7-НБТДО 10 мкМ и 5,7-ДНБТДО 10 мкМ.

Активность рГЦ	Без добавок	Добавленные соединения						
		в отсутствие глутатиона			в присутствии глутатиона			
		5-НБТДО	7-НБТДО	5,7-ДНБТДО	—	5-НБТДО	7-НБТДО	5,7-ДНБТДО
Удельная активность рГЦ, пмоль с цГМФ/мин на 1 мг белка	94±9	424±34	1415±109	771±59	92±8	1060±81	2972±242	1928±148
Степень активации рГЦ	1,0	4,5	15,6	8,2	—	11,3	31,6	20,5

**Примечание.** Приведены средние величины из 4 – 5 независимых экспериментов

Сравнительно невысокая степень активации фермента в присутствии в пробе 20 мкМ дитиотрейтола значительно увеличивалась (более чем в 2 раза) при добавлении 100 мкМ восстановленного глутатиона, что подтверждало тиолзависимый механизм активации гуанилатциклазы.

Наиболее мощным активатором гуанилатциклазы в данной группе соединений оказался 7-нитробензотетразин-1,3-диоксид, являющийся в свою очередь и наиболее эффективным донором оксида азота. NO-зависимый механизм активации гуанилатциклазы, исследованными соединениями подтверждался снижением стимулирующего эффекта 7-нитропроизводного в присутствии стандартной «ловушки» NO Carboxy-PTIO (табл.3). Как видно из таблицы 3, Carboxy-PTIO (50мкМ) тормозит

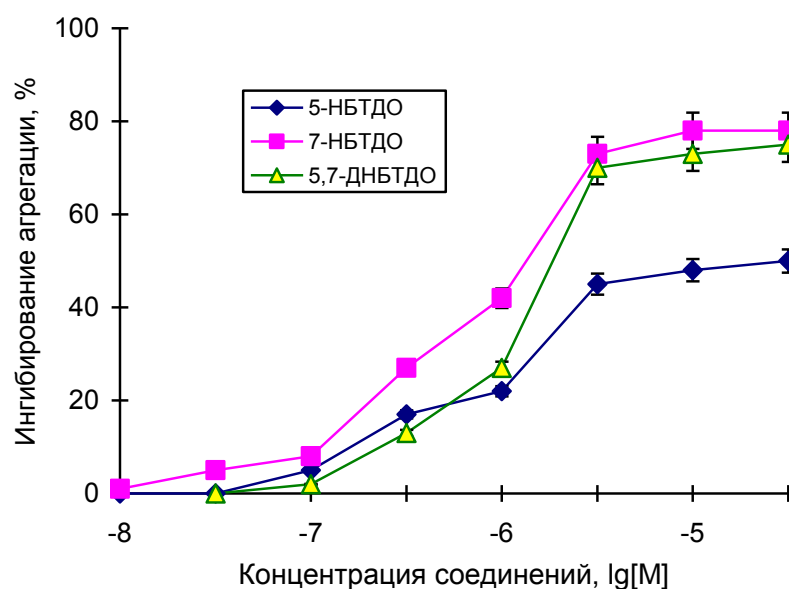
активацию гуанилатциклазы на 78%.

**Таблица 3.** Влияние 50 мкМ 2-(4-карбоксифенил)-4,4, 5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксида (Carboxy-PTIO) на активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) тромбоцитов человека 10 мкМ 7-нитробензотетразин-1,3-диоксидом (7-НБТДО)

Активность pГЦ	Без добавок	Добавленные соединения		
		Carboxy-PTIO	7-НБТДО	7-НБТДО + Carboxy-PTIO
			с глутатионом (100 мкМ)	с глутатионом (100 мкМ)
Удельная активность pГЦ, пмоль цГМФ/мин на 1 мг белка	91±10	110±7	3636±89	800±58
Степень активации pГЦ	1	1,2	40,0	8,8
Торможение активации pГЦ, %	—	—	—	78

**Примечание.** Приведены средние величины из 3 – 4 независимых экспериментов.

Способность исследованных нитробензотетразин-1,3-диоксидов активировать гуанилатциклазу обусловило и их ингибирующее действие на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис.2).



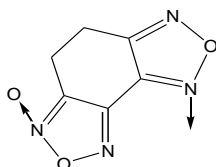
**Рисунок 2.** Зависимость ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека от концентраций 5-НБТДО, 7-НБТДО и 5,7-ДНБТДО. Приведены данные из 6 независимых экспериментов .

Интенсивность их тормозящих эффектов находилась в полном соответствии с количеством NO, образовавшегося из этих соединений и степенью активации гуанилатциклазы. Наиболее эффективный донор NO и активатор гуанилатциклазы (7-

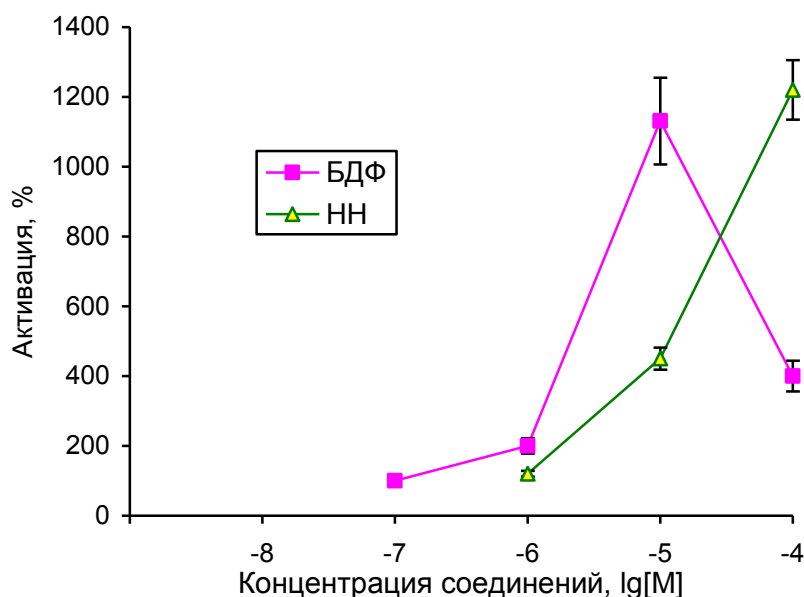
НБДТО) оказался и наиболее сильным ингибитором АДФ-индуцированной агрегации с величиной  $IC_{50}$  равной 1мкМ. Для 5,7-ДНБТДО и 5-НБДТО величины  $IC_{50}$  составляли 2 и 10мкМ, соответственно (рис.2).

**Бензодифуроксан.** Производные фураксана (1,2,5-оксадиазол-2-оксида) привлекли к себе внимание, так как многие из этих соединений обладали фармакологической активностью, имитирующей действие оксида азота. Было показано, что эти соединения взаимодействуют с SH-группами и генерируют NO.

Химическая формула соединения:



Бензодифуроксан был впервые синтезирован в 1974г. и изучены его антигипертензивные свойства, которые превосходили по эффективности аналогичные свойства нитроглицерина. В то же время биохимические свойства бензодифуроксана не исследовались. Мы более подробно изучили механизм его антигипертензивного действия. Представленные на рис.3 данные впервые показали, что бензодифуроксан является эффективным стимулятором гуанилатциклазной активности, превосходящим по эффективности активацию фермента нитропруссидом натрия.



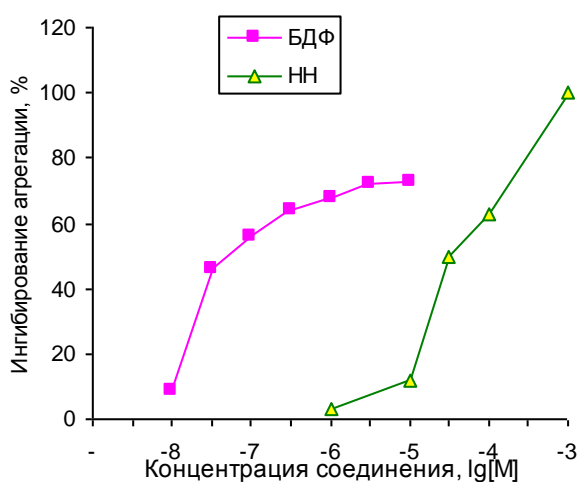
**Рисунок 3. Влияние бензодифуроксана (БДФ) и нитропруссида натрия (НН) на активность растворимой гуанилатциклазы.** Представлены средние значения из 4 независимых экспериментов.

NO-зависимый механизм активации гуанилатциклазы бензодифуроксаном

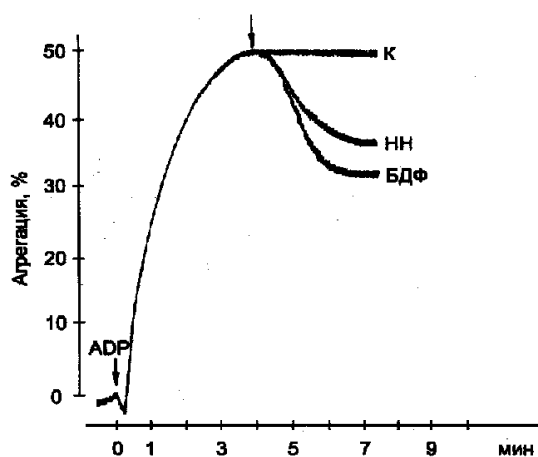
подтверждался торможением его стимулирующего эффекта в присутствии ODQ (0,3 мкМ) на 75%, а с нитропруссидом натрия на 80%.

Способность бензодифуроксана активировать гуанилатциклазу обусловила и антиагрегантные свойства соединения. Как видно из рис.4 и 5, эффективность антиагрегантных свойств определялась интенсивностью стимулирующего влияния на фермент. Более сильный стимулирующий эффект бензодифуроксана по сравнению с нитропруссидом натрия объяснял и более резко выраженную способность бензодифуроксана ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 4) и более сильное дезагрегационное действие (рис.5).

Кроме того, впервые показано, что бензодифуроксан является высокоэффективным ингибитором агрегации тромбоцитов, с величиной  $IC_{50}$  равной  $6 \cdot 10^{-8} M$ ; для нитропрусида натрия  $IC_{50}$  составляет  $5 \cdot 10^{-5} M$ .



**Рисунок 4. Зависимость ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека от концентрации бензодифуроксана (БДФ) и нитропрусида натрия (НН).** Приведены средние величины из трёх независимых экспериментов.



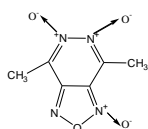
**Рисунок 5. Агрегограмма АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека (контроль, К) и дезагрегационный эффект бензодифуроксана (БДФ 0,01 мМ) и нитропрусида натрия (НН 0,1 мМ)**

Время добавления соединений указано стрелкой. По оси абсцисс время после добавления АДФ, мин.

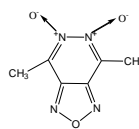
**Производные фуруксана, конденсированные с пиридазин-ди-N-оксидным циклом.** Фуруксаны рассматриваются как пролекарства и фуруксановое кольцо часто вводят в молекулу других доноров NO для усиления их биологической активности. В институте органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН было синтезировано новое производное фуруксана в котором фуруксановое кольцо конденсировали с пиридазин-

ди-N-оксидной группировкой: 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазол[3,4-d]-пиридазин-1,5,6-триоксид (ОПТО).

Мы сравнили свойства этого соединения с его структурным аналогом, но производным фуразана – 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазол-[3,4-d]-пиридазин-5,6-диоксид (ОПДО). Химические формулы соединений:



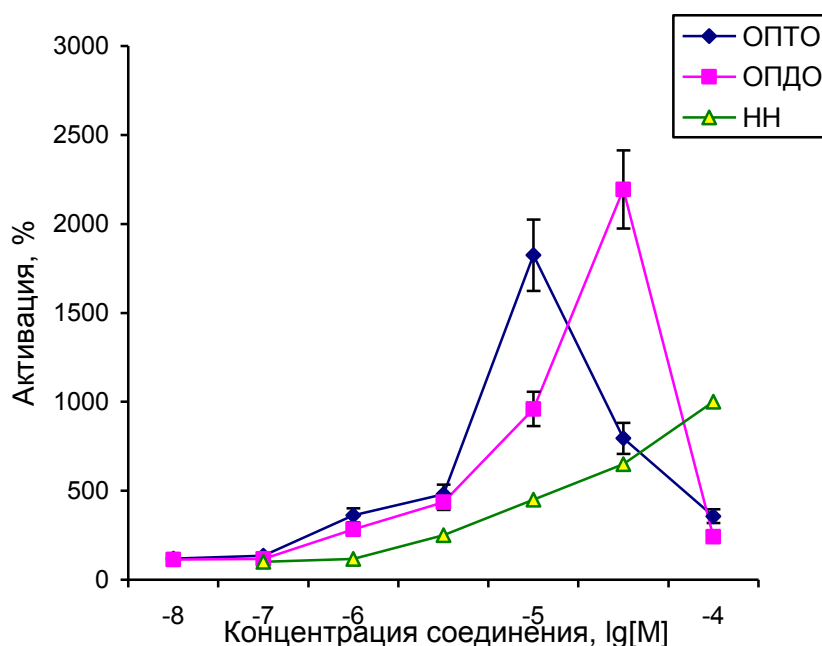
производное  
фуроксана (ОПТО)



производное фуразана  
(ОПДО)

Известно, что фуроксановое кольцо генерирует оксид азота, тогда как фуразановое – не обладает такой способностью. Оба соединения взаимодействуют с тиолами. В опытах с ОПТО при этом генерируется оксид азота. В случае же ОПДО не образуется сколько-нибудь значительных количеств NO. Таким образом, фуроксановое кольцо действительно необходимо для генерирования NO.

Результаты исследований способности ОПТО и ОПДО активировать растворимую гуанилатциклазу представлены на рис.6.



**Рисунок 6. Влияние ОПТО, ОПДО и нитропруссид натрия (НН) на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека.** Базальная удельная активность составила  $118 \pm 9$  пмоль цГМФ в минуту на 1 мг белка. Представлены средние значения из 7 независимых экспериментов.

Из рисунка видно, что оба соединения (ОПТО и ОПДО) являются более мощными активаторами гуанилатциклазы, чем нитропруссид натрия. При  $10 \mu\text{M}$  концентрациях

ОПТО, ОПДО и нитропрусида натрия активация гуанилатциклазы составляла 1820; 960 и 450% , соответственно. Более высокий стимулирующий эффект ОПТО по сравнению с ОПДО вполне объясним, поскольку первое соединение генерирует оксид азота, в отличие от ОПДО.

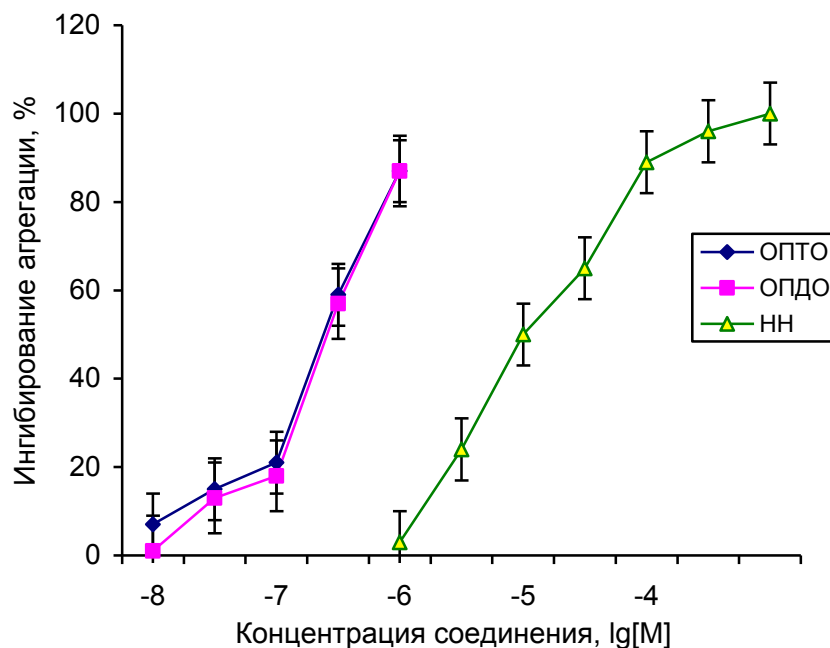
Однако отсутствие NO-донорных свойств у ОПДО не согласовывалось с достаточно высокой (960%) степенью активации гуанилатциклазы этим соединением (рис.6). Поэтому мы исследовали влияние на стимуляцию гуанилатциклазы ОПТО, ОПДО и нитропрусида натрия известного ингибитора NO-зависимой активации фермента ODQ (табл.4).. Из таблицы видно, что ODQ (0,3 мкМ) с практически одинаковой интенсивностью тормозит стимуляцию фермента ОПТО и ОПДО на 40 и 49%, соответственно, но на 75% ингибирует активацию гуанилатциклазы нитропрусидом натрия. Следует заметить, что ODQ на самом деле является гемзависимым ингибитором, т.е. он окисляет  $Fe^{2+}$  гема гуанилатциклазы в  $Fe^{3+}$ , препятствуя тем самым взаимодействию NO с гемом.

**Таблица 4.** Влияние ODQ на активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека ОПТО, ОПДО и нитропрусида натрия (НН).

Добавки	Без добавок	В присутствии					
		ОПТО ( $10^{-5}$ М)		ОПДО ( $10^{-5}$ М)		НН ( $10^{-5}$ М)	
	УА	УА	Активация %	УА	Активация %	УА	Активация %
Без ODQ	61,5±9	1700±273	27,6	935±156	15,5	517±82	8,4
В присутствии ODQ (0,3 мкМ)		1025±161	16,7	458±71	7,4	123±18	2,0
Торможение, %			40		49		75

**Примечание.** В таблице представлены величины удельной активности (УА) растворимой гуанилатциклазы в пмоль цГМФ в минуту на 1 мг белка. Приведены средние величины из 7 независимых экспериментов.

На рис.7 сопоставлены данные о способности ОПТО, ОПДО и нитропрусида натрия ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.



**Рисунок 7. Зависимость ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека от концентрации ОПТО, ОПДО и НН. Приведены средние величины из 5 независимых экспериментов.**

Из рисунка видно, что оба соединения (ОПТО и ОПДО) являются мощными ингибиторами агрегации тромбоцитов. В конечной концентрации (по 10мкМ) они тормозят АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на ее обратимой стадии с одинаковой интенсивностью и величиной  $IC_{50}$  равной  $5 \cdot 10^{-7} M$ .

Здесь уместно отметить, что ОПТО, генерирующий NO, обладает и вазорелаксантной активностью. Эти исследования были проведены на кафедре физиологии МГУ им. М.В. Ломоносова (Kotz et al., 2000). Антигипертензивный эффект ОПТО проявлялся уже при  $10^{-9} M$  и усиливался при увеличении концентрации до  $10^{-6} M$ . ОПДО не обладал вазодилататорным свойством в этих условиях. Отсюда можно заключить, что для проявления гипотензивного эффекта соединение должно быть NO-донором. С другой стороны, оба соединения являются мощными ингибиторами АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, обладающими одинаковой интенсивностью (рис.7). Эти данные позволяют заключить, что для проявления антиагрегантных свойств NO-зависимый механизм активации фермента необязателен. По-видимому, основными причинами, которые отвечают за биологическую активность ОПТО и ОПДО является наличие в их молекулах пиридазин-ди-N-оксидной группировки. Она взаимодействует с тиолами (включая цистеин и глутатион) и способствует генерированию NO из ОПТО, но не ОПДО. Кроме того, эта группировка является



акцептором электронов и может реагировать с металлопорфиринами, в том числе и с гемом гуанилатциклазы окисляя  $Fe^{2+}$  гема в  $Fe^{3+}$  (Kotz et al., 2000). В связи с такой способностью пиридазин-ди-N-оксидной группировки становится понятным почему интенсивность торможения ODQ активации гуанилатциклазы ОПТО и ОПДО является одинаковой (на 40 и 49%, соответственно) (табл.4). Не исключено, что оба соединения взаимодействуют с  $Fe^{2+}$  гема, по аналогии с тем как это имеет место при взаимодействии NO с  $Fe^{2+}$  гема при активации фермента NO-донорами. При этом механизм активации будет NO-независимым. Но поскольку ОПТО является NO-донором, механизм активации гуанилатциклазы этим соединением будет также и NO-зависимым. Более сильный гипотензивный эффект ОПТО по сравнению с ОПДО (Kotz et al., 2000) и практически одинаковая интенсивность антиагрегантного действия соединений (рис.7), позволяет заключить, что для реализации вазодилаторного действия необходима NO-зависимая активация гуанилатциклазы, а для ингибирования агрегации тромбоцитов механизм активации фермента несущественен.

Итак, результаты, полученные при исследовании свойств ОПТО и ОПДО позволяют сделать вывод о том, что для создания эффективных вазодилаторов – активаторов гуанилатциклазы, являющихся NO-донорами – необходимо введение в молекулу NO-донора дополнительной группировки, способной активировать гуанилатциклазу по NO-независимому механизму. Это резко усилит стимулирующий эффект NO-донора и вызовет мощное антигипертензивное действие. В то же время, значительно меньшее стимулирующее действие на гуанилатциклазу за счет NO-донорных свойств соединения, снизит возможность возникновения и развития толерантности.

### **Изучение ингибиторов NO-зависимой активации тромбоцитарной гуанилатциклазы.**

**Карнозин – эндогенный дипептид.** Карнозин ( $\beta$ -аланин-L-гистидин) природный дипептид, был открыт В.С.Гулевичем в составе экстрактивных соединений мышечной ткани в начале XX века. К настоящему времени установлены важные биологические функции, выполняемые этим природным дипептидом, в частности, проявление им антиоксидантных свойств. Эти свойства реализуются за счет связывания продуктов окисления липидов, взаимодействия с активными формами кислорода, гидроксильными радикалами. С процессом перекисного окисления липидов и

свободнорадикальными реакциями непосредственно связана и растворимая гуанилатциклаза. Более того, полагают, что свободные радикалы являются эндогенными регуляторами этого фермента.

О взаимодействии карнозина с оксидом азота – данных нет. В то же время, известна способность карнозина образовывать хелатные комплексы с ионами двухвалентных металлов в том числе и с  $Fe^{2+}$ . Активация гуанилатциклазы оксидом азота обусловлена взаимодействием NO с  $Fe^{2+}$  гема, входящего в молекулу фермента. Не исключено, что антиоксидантные свойства карнозина, а также его способность образовывать хелатные комплексы с двухвалентным железом могут модулировать функционирование растворимой гуанилатциклазы.

Мы исследовали влияние карнозина на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента нитропруссидом натрия. Данные представлены в табл.5. Из данных таблицы видно, что в опытах с супернатантом 105000g, полученным из озвученной суспензии тромбоцитов, карнозин в конечной концентрации 1мМ не влияет на активность гуанилатциклазы, а в концентрации 5 мМ снижает базальную активность на 22%.

**Таблица 5.** Влияние карнозина на активность гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента нитропруссидом натрия (НН, 100мкМ) и протопорфирином IX (ПТП, 5 мкМ).

Фермент	Добавки	Активность, пмоль цГМФ/мин/мг белка	Степень активации	
			НН	ПТП
Супернатант 105 000g	без карнозина	183 ± 10	29 ± 2,0	6,8 ± 0,4
	с карнозином 1мМ	177 ± 10	10 ± 1,6	6,5 ± 0,2
	с карнозином 5мМ	142 ± 11	5,7 ± 1,7	
Элюат ДЭАЭ-целлюлозы	без карнозина	1185	4,1 ± 0,9	7,5 ± 1,0
	с карнозином 1мМ	1195	4,4 ± 1,0	7,9 ± 0,5

**Примечание.** Приведены средние величины из 5 независимых экспериментов.

Также видно, что карнозин подавляет способность тромбоцитарной гуанилатциклазы активироваться нитропруссидом натрия. При концентрации

карнозина 1мМ активация нитропруссидом натрия снижается в 3 раза, а при 5мМ - в 5 раз.

Поскольку действие нитропруссида натрия обусловлено взаимодействием NO-группы с железом гема гуанилатциклазы, мы исследовали влияние карнозина на активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия при развитии гемдефицитности фермента. Ранее было показано, что 7 – 8-кратная очистка тромбоцитарной гуанилатциклазы человека, при хроматографии супернатанта 105000g через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, сопровождалась снижением способности фермента активироваться нитропруссидом натрия на 70 – 80%. Из УФ спектра такого препарата гуанилатциклазы исчезал максимум поглощения при 415 – 420нм (полоса Сорэ), присутствующий в исходном супернатанте 105000g. Другими словами, частично очищенный препарат гуанилатциклазы находился в гем-дефицитной форме.

Из результатов, представленных в табл. 5 видно, что степень активации нитропруссидом натрия такого препарата гуанилатциклазы снижалась на 86% (с 29 до 4,1). Также видно, что карнозин в концентрации 1мМ не влияет на базальную активность фермента и на его способность активироваться нитропруссидом натрия. Таким образом, карнозин не тормозит активацию нитропруссидом натрия гем-дефицитного препарата гуанилатциклазы.

Стимулирующий эффект протопорфирина IX не связан с гемом. Из табл.5 видно, что в опытах с супернатантом 105000g добавление карнозина (1мМ) на 66% снижает стимулирующий эффект нитропруссида натрия, но не влияет на активацию фермента протопорфирином IX. В опытах с частично очищенным гем-дефицитным препаратом активация фермента нитропруссидом натрия снижается и этот уровень уже не изменяется при добавлении карнозина (1 мМ). Интенсивность активирующего действия протопорфирина IX на гем-дефицитный препарат фермента остается той же, что и в опытах с супернатантом 105000g. и степень активации не меняется при добавлении карнозина.

Мы изучили влияние карнозина на стимуляцию гуанилатциклазы тромбоцитов человека производного фуросана, конденсированного с пиридазин-ди-N-оксидной группировкой: 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазол[3,4-d]пиридазин1,5,6-триоксазида (ОПТО), NO-донора, а также соответствующего производного фуразана: 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазол[3,4-d]пиридазин5,6-диоксида (ОПДО), не генерирующего NO.

Полученные результаты представлены в табл.6.

**Таблица 6.** Влияние карнозина и ODQ на активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) тромбоцитов человека нитропруссидом натрия, ОПТО и ОПДО

Добавки	Удельная активность ГЦ (пмоль cGMP/мин/мг белка)	Активация (%)	Торможение (%)
НН (0,1 мМ) без карнозина	1256 ± 100	1570	
с карнозином (1 мМ)	326 ± 26	408	74
с ODQ (0,3мкМ)	314 ± 20	392	75
ОПТО (0,01 мкМ) без карнозина	1961 ± 137	2451	
с карнозином (1 мМ)	736 ± 60	954	61
с ODQ (0,3 мкМ)	1176 ± 80	1470	40
ОПДО (0,01 мкМ) без карнозина	1504 ± 140	1880	
с карнозином (1 мМ)	1530 ± 137	1912	0
с ODQ (0,3 мкМ)	797 ± 47	996	47

**Примечание.** Приведены средние значения из 3-4 независимых экспериментов.

Из таблицы видно, что карнозин (1мМ) резко тормозит активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия и ОПТО на 74 и 61%, соответственно. Однако карнозин (1мМ) в тех же условиях не изменяет стимуляцию гуанилатциклазы ОПДО (0,01мМ), не являющегося донором оксида азота (0%). Из таблицы также видно, что ODQ (0,3мкМ) подавляет на 75% активацию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия и с одинаковой интенсивностью (40 и 47%) тормозит стимуляцию фермента ОПТО (донора NO) и ОПДО (не генерирующего NO). Эти результаты позволяют рассматривать карнозин в качестве селективного ингибитора NO-зависимой активации гуанилатциклазы.

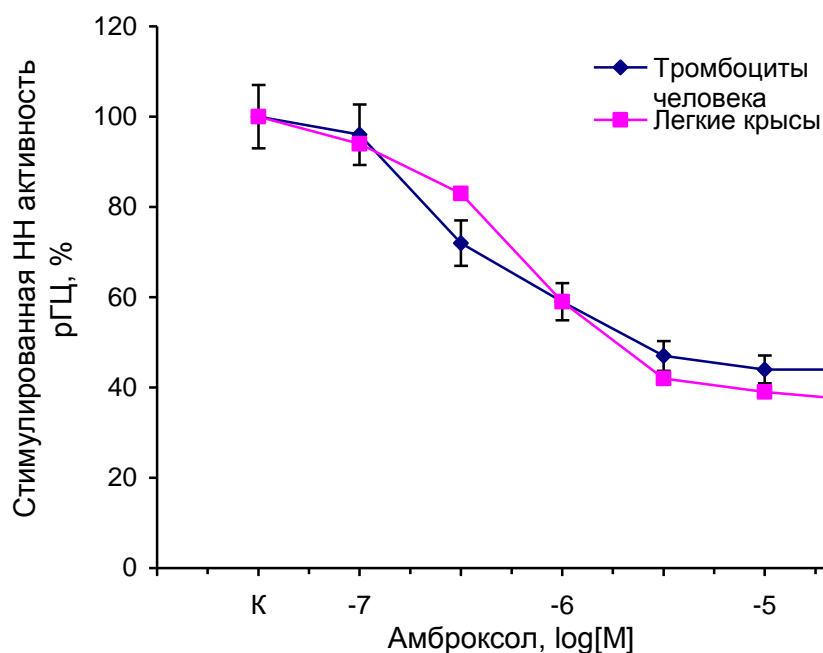
На это указывают и выявленные нами конкурентные отношения между карнозином и нитропруссидом натрия за связывание с гемом гуанилатциклазы, потеря тормозящего эффекта карнозина в опытах с гемдефицитной гуанилатциклазой, а также отсутствие торможения карнозином активации фермента протопорфирином IX.

Способность карнозина взаимодействовать с гемом гуанилатциклазы имеет особое значение, поскольку позволяет использовать этот дипептид для выявления степени насыщенности фермента гемом или его гемдефицитности, а следовательно, и нарушения эндогенной регуляции гуанилатциклазы.

Вывод о том, что карнозин является селективным ингибитором NO-зависимой активации гуанилатциклазы, открывает возможность использования карнозина в качестве лечебного средства при патологических состояниях, связанных с избытком

образования NO в организме, например, астма, сепсис, мигрень.

**Амброксол-муколитический препарат.** Отсутствие в настоящее время в качестве лекарственных средств ингибиторов NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы, побудило нас выяснить возможную роль сигнальной системы NO – растворимая гуанилатциклаза – цГМФ в действии лекарств, которые применяются при лечении заболеваний, связанных с избыточным генерированием NO – например, при астме. Таким лекарством является муколитический препарат – амброксол (lasolvan) – производное алкалоида визицина, являющегося активным метаболитом бромгексина (bisolvan). Интенсивное образование NO при этих патологических состояниях обусловлено экспрессией индуцибельной NO-синтазы, которая сопровождается резким повышением активности растворимой гуанилатциклазы и накоплением цГМФ.



**Рисунок 8.** Влияние амброксола на стимулированную нитропруссидом натрия (НН) активность растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека и легких крысы. Активность гуанилатциклазы определена в отсутствии (К) и присутствии амброксола (0,1 – 50 мкМ). За 100% принята активность гуанилатциклазы в отсутствии амброксола. Приведены средние величины из 3 независимых экспериментов.

Для исследования возможного биохимического механизма терапевтического действия амброксола, было изучено влияние амброксола на активность растворимых

гуанилатциклаз из тромбоцитов человека и легких крыс, а также стимуляцию обоих ферментов NO-донорами (нитропруссидом натрия и сиднонимином (Sin-1)).

На рис.8 представлены данные по влиянию амброксола на индуцированную нитропруссидом натрия активацию растворимой гуанилатциклазы из тромбоцитов человека и легких крысы. Амброксол в диапазоне концентраций от 0,1 до 10мкМ ингибирует стимуляцию ферментов нитропруссидом натрия с величинами  $IC_{50}$  равными 3,9 и 2,1мкМ для гуанилатциклаз из тромбоцитов человека и легких крысы, соответственно.

Амброксол тормозит также (на  $73,0 \pm 6,3\%$ ) активацию гуанилатциклазы тромбоцитов человека Sin-1 ( $10^{-5}M$ ) – другого NO-донора, однако добавление амброксола (10 мкМ) не влияет на активацию растворимой гуанилатциклазы протопорфирином IX (5 мкМ). Эти данные указывают, что молекулярный механизм терапевтического действия амброксола включает в себя ингибирование NO-зависимой активации гуанилатциклазы.

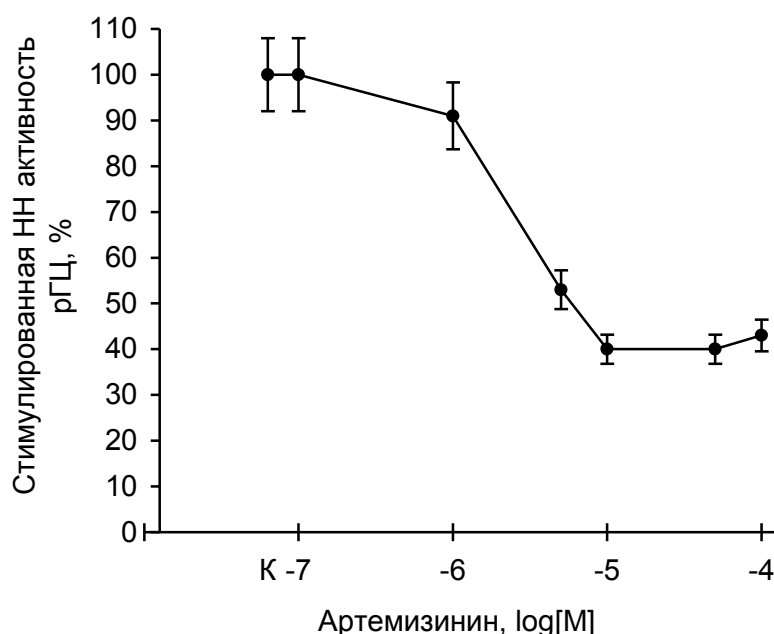
В результате проведенных исследований была впервые выявлена способность амброксола избирательно тормозить NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы, а также обнаружена аналогия в интенсивности ингибирования амброксолом активации NO-донором (нитропруссидом натрия) двух гуанилатциклаз (из тромбоцитов человека и легких крыс, рис.9). Эти данные показали, что исследование активности фермента в тромбоцитах больных астмой и ингибирование этой активности амброксолом может быть использовано для разработки нового биохимического теста для определения тяжести заболевания и эффективности лечения амброксолом используя тромбоциты.

Полученные нами данные о торможении амброксолом NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы впервые указывают на возможность создания новых эффективных муколитических средств на основе ингибиторов NO-зависимой активации гуанилатциклазы. Преимуществом подобных лекарственных препаратов было бы подавление только избыточного образования NO и при этом не нарушался бы синтез оксида азота необходимый для регуляций нормальных физиологических функций дыхательного тракта.

**Артемизинин - антималярийный препарат.** Роль гуанилатциклазы при малярийной интоксикации изучена недостаточно. Есть данные, что цГМФ может

участвовать в индукции эксфлагелляции (образование микрогамет у малярийного токсина). Фармакологический эффект препарата связывают с взаимодействием соединения с гемом или гемом. Следует заметить, что целый ряд соединений способных связываться с гемом, обладают антималярийной активностью. Для изучения возможной роли гуанилатциклазы в механизме фармакологического действия артемизинина мы исследовали влияние последнего на активацию растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека NO-генерирующими соединениями относящихся к различным классам химических соединений: нитропруссидом натрия, сиднониминном (Sin-1) и производным фуроксана-3,4-дициано-1,2,5-оксадиазол-2-оксидом.

Мы показали, что артемизинин концентрационно зависимым образом ингибирует индуцированную нитропруссидом натрия (100 мкМ) активацию гуанилатциклазы с величиной  $IC_{50}$  равной 5,6 мкМ (рис. 9).



**Рисунок 9. Торможение артемизинином стимулированной нитропруссидом натрия активности растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека.** Активность гуанилатциклазы определена в отсутствие (К) и присутствии артемизинина (0,1 – 100 мкМ). За 100% принята активность гуанилатциклазы в отсутствие артемизинина. Приведены средние величины из 4 независимых экспериментов.

Артемизинин в конечной концентрации 10 мкМ тормозит также активацию фермента и другими NO-донорами: Sin-1 (10 мкМ) на  $87 \pm 7\%$  и 3,4-дициано-1,2,5-

оксадиазоло-2-оксидом (10 мкМ) на  $71 \pm 4\%$ . В то же время артемизинин не влияет на активацию фермента протопорфирином IX, активация которым не связана с гемом. Эти результаты предполагают участие гема гуанилатциклазы в механизме торможения артемизинином NO-зависимой активации фермента.

С другой стороны, возможно, что выявленный эффект артемизинина обусловлен взаимодействием NO с кислородными радикалами, образующимися из артемизинина при его реакции с гемом гуанилатциклазы. Однако отсутствие влияния супероксиддисмутазы и каталазы на ингибиторный эффект артемизинина исключает такую возможность. Торможение артемизинином (10 мкМ) активации гуанилатциклазы нитропруссидом натрия без и в присутствии супероксиддисмутазы (167 ед/мл) или каталазы (127 ед/мл) составляет  $60 \pm 3,6\%$ ,  $58 \pm 2,9\%$  и  $63 \pm 4\%$ , соответственно.

Данные о роли NO при малярии не позволяют сделать окончательный вывод о биохимическом механизме, ответственным за терапевтическое действие артемизинина. В то же время следует заметить, что ингибирование NO-зависимой активации фермента артемизинином наблюдается при его терапевтических концентрациях в интервале от 0,2 до 12,8 мкМ. Величина  $IC_{50}$  для артемизинина, определенная нами, (5,6 мкМ) как раз находится в интервале этих концентраций. Это предполагает, что действие этого антималярийного средства включает в себя ингибирование NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы.



## ВЫВОДЫ

1. Новые, ранее не исследованные потенциальные доноры оксида азота: производные N-нитропиразола, различающиеся заместителями в 3, 4 и 5 положениях пиразольного кольца, 5-нитро, 7-нитро, и 5,7-динитробензотетразин-1,3 диоксиды, бензодифуроксан генерируют оксид азота (NO), активируют растворимую гуанилатциклазу и ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека с интенсивностью находящейся в полном соответствии со способностью соединений генерировать NO и активировать гуанилатциклазу.

2. Производное фуроксана, конденсированное с пиридазин-ди-N-оксидной группировкой – 4,7 –диметил-1,2,5-оксадиазол-[3,4-*d*]пиридазин-1,5,6-триоксид (ОПТО), являющийся NO-донором и его структурный аналог, производное фуразана – 4,7-диметил-1,2,5-оксадиазол-{3,4-*d*} пиридазин-5,6-диоксид (ОПДО), не генерирующего NO являются мощными активаторами гуанилатциклазы и тормозят АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов с одинаковой интенсивностью ( $IC_{50}$  равной  $5 \cdot 10^{-7}$  М). Сделано заключение, что для проявления гипотензивных свойств механизм активации гуанилатциклазы должен быть (хотя бы частично) NO-зависимым, тогда как эффективность антиагрегантного действия не зависит от механизма активации фермента.

3. Карнозин (эндогенный дипептид) является селективным ингибитором NO-зависимой активации гуанилатциклазы. Он тормозит активацию фермента NO-донорами, но не влияет на стимуляцию гуанилатциклазы соединениями не генерирующими NO. Ингибирование карнозином NO -зависимой активации гуанилатциклазы обусловлено взаимодействием карнозина с  $Fe^{2+}$  гема фермента.

4. Амброксол (муколитический препарат) и артемизинин (антималарийное средство) - ингибируют NO-зависимую активацию гуанилатциклазы и не влияют на активацию фермента протопорфирином IX. Выдвинуто представление, что молекулярный механизм терапевтического действия этих препаратов включает в себя ингибирование NO -зависимой активации растворимой гуанилатциклазы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пятакова Н.В., Северина И.С. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме действия лекарственных средств.// Биомед.химия. 2012. Т. 58(1). С. 32-42.
2. Северина И.С., Пятакова Н.В., Щеголев А.Ю., Сидорова Т.А. YC-1-аналогичное потенцирование NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы адренохромом. // Биомед. химия. 2008. Т. 54(6) С. 679-686.
3. Severina I.S., Pyatakova N.V., Postnikov A.V., Preobrazhenskaya M.H., Khropov Yu.V. Antitumor antibiotic streptonigrin and its derivatives as inhibitors of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase.// Eur. J.Pharmacol. 2004. V. 483. P. 127-132.
4. Severina I.S., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Malenkova I.V., Vanin A.F. Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors - S-nitrosothiols and dinitrosyl-iron complexes with thiol containing ligands.// NitricOxide. Biology and Chemistry. 2003.V. 8 P. 153-163.
5. Severina I.S., Pyatakova N.V., Bussygina O.G., Mikhailitsin F.S., Khropov Y.V., Inhibition of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase by the antimalarial drug, artemisinin.// Eur. J.Pharmacol. 2002. V. 438. P. 69-73.
6. Пятакова Н.В., Хропов Ю.В., Чураков А.М., Тарасова Н.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф., Тартаковский В.А., Северина И.С. Производные бензотетразин-1,3-диоксида- новые доноры оксида азота, активаторы растворимой гуанилатциклазы и ингибиторы агрегации тромбоцитов.// Биохимия 2002. Т. 67(3). С. 396-402.
7. Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В. Активация растворимой гуанилатциклазы новыми донорами NO-как основа направленного поиска новых эффективных вазодилататоров и антиагрегантов.// Вестник РАМН. 2000. №4. С. 25-30.
8. Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В., Хропов Ю.В., Овчинников И.В., Махова Н.Н., Северина И.С. Бензодифуроксан как NO-зависимый активатор растворимой гуанилатциклазы.// Биохимия. 2000. Т65(4). С. 540-546.
9. Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В. Карнозин как регулятор растворимой гуанилатциклазы. // Биохимия. 2000. Т65(7). С. 921-927.
10. Severina I.S., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Khropov Yu.V., Krasnoperov R.A. Ambroxol as an inhibitor of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase // Eur. J.Pharmacol. 2000. V.407. P. 61-64.
11. Хропов Ю.В., Пятакова Н.В., Гаврилова С.А., Бусыгина О.Г., Красноперов Р.А., Северина И.С. Ингибитор NO-зависимой активации растворимой формы гуанилатциклазы. Патент 2189392 РФ. №2001101366/13; заявл. 16.01.2001; опубл. 20.09.2002.