



Н.И. Горбунова, Н.Е. Блажеевский

Сравнительное изучение антиагрегантной активности S-нитрозоглутатиона и тринитроглицерина

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключові слова:
S-нітрозоглутатіон,
тринітроглицерин,
антиагрегантна активність.

Ключевые слова:
S-нитрозоглутатион,
тринитроглицерин,
антиагрегантная активность.

Key words: S-nitrosoglutathione,
glycerol trinitrate, antiplatelet activity.

Проведені порівняльні дослідження інгібування агрегації тромбоцитів S-нітрозоглутатионом та тринітроглицерином *in vitro*, визначені їх ефективні концентрації. Зроблено висновок, що S-нітрозоглутатіон має значні переваги як антиагрегант у порівнянні з тринітроглицерином.

Проведены сравнительные исследования ингибирования агрегации тромбоцитов S-нитрозоглутатионом и тринитроглицерином *in vitro*, определены их эффективные концентрации. Сделан вывод о преимуществе S-нитрозоглутатиона как антиагреганта в сравнении с тринитроглицерином.

Direct comparison of the effect of S-nitrosoglutathione and glycerol trinitrate on human platelet aggregation *in vitro* was carried out and their effective concentrations were determined. S-nitrosoglutathione is more effective as an antiplatelet agent compared to glycerol trinitrate.

В настоящее время активно исследуются различные аспекты биологического действия оксида азота (NO), уникальной молекулы, выполняющей роль физиологического мессенджера, а в некоторых случаях – цитотоксической эффекторной молекулы. При нарушении выработки NO в клетках в терапевтических целях применяют доноры NO (нитросорбит, эринит, нитроглицерин, нитропруссид натрия, известные в фармакологии как нитраты, нитриты, к которым относится амилнитрит) [1,2]. Эти вещества с участием эндогенных окислительно-восстановительных систем способны генерировать NO, который, реагируя с тиолсодержащими соединениями (альбумин, цистеин, глутатион), приводит к образованию S-нитрозотиолов [3]. Роль активации тромбоцитов в патогенезе различных заболеваний человека и данные о том, что NO-опосредуемые эффекты снижены при гипертонической болезни, диабете и атеросклерозе, подтверждают, что введение доноров NO может быть успешным [4]. Однако применение органических нитратов неэффективно из-за развития толерантности и явления так называемого «рикошета», которые были описаны еще в 20-х годах прошлого века [5]. В связи с этим, идеальными донорами NO являются S-нитрозотиолы [6].

Цель работы

Синтез, хроматографический анализ S-нитрозоглутатиона (GSNO) и сравнительное исследование влияния GSNO и тринитроглицерина (TNG) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Синтез GSNO осуществляли по реакции S-нитрозирования тиолат-аниона ионом нитрозония в кислой среде [7]. Чистоту полученного продукта контролировали методом ВЭЖХ. Использовали хроматограф МилиХром А-02 (Новосибирск, АТ «Еконова»); колонка 2x75 мм с сорбентом Nucleosil 100-5 с привитой фазой C18 и элюировали в градиентном режиме: элюент А – метанол- фосфатный буфер (pH2,2) +1 мМ октил-

сульфоновой кислоты в соотношении 10:90; элюент Б – метанол-фосфатный буфер (pH2,2)+1 мМ октилсульфоновой кислоты в соотношении 5:95. Скорость элюирования 150 мкл/мин, температура колонки – 45°C, давление – 4,5 МПа. Время удерживания S-нитрозоглутатиона – 8,8 мин. (рис. 1).

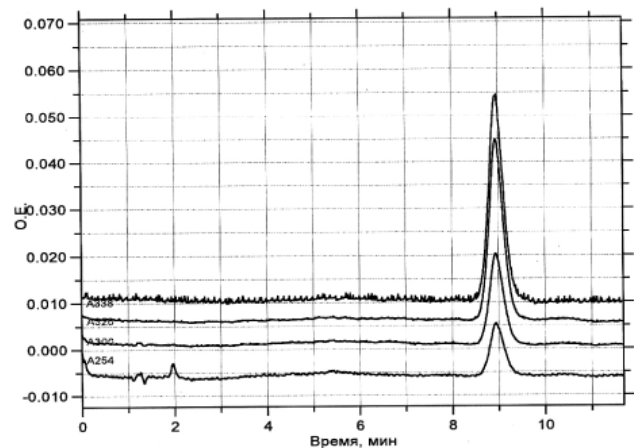


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ S-нитрозоглутатиона.

Детектирование осуществляли спектрофотометрически при $\lambda=334$ нм ($\epsilon=940$ моль⁻¹ см⁻¹). Маточный раствор GSNO объемом 20 мкл хранили в жидком азоте. Для повышения pH до 7,0 к этому замороженному раствору добавляли 980 мкл фосфатного буфера (pH 7,0). Растворы с конечной концентрацией GSNO от 10⁻⁴ до 10⁻⁹ М получали последовательным разбавлением. Обогащенная тромбоцитами плазма (БТП) получена методом дифференциального центрифугирования венозной крови здоровых доноров (n=7) при 2000 g в течение 2 мин. БТП инкубировали с растворами GSNO при 37°C в течение 30 мин, после чего исследовали АДФ-индуцируемую (10⁻⁴ М) агрегацию тромбоцитов. Препаратом сравнения служил TNG («Нитро», Orion Pharma, Финляндия). Содержание TNG в растворах контролировали кинетичес-

ким методом [8]. Статистическую обработку результатов проводили общеизвестными методами.

Результаты и их обсуждение

Обнаружено ингибирование АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов при действии GSNO и TNG. Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации исследуемых веществ представлена на рис. 2 и рис. 3.

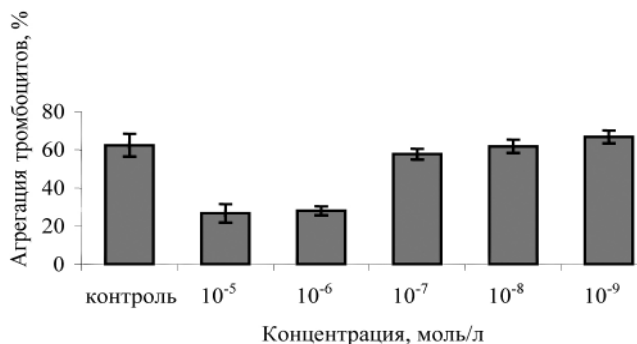


Рис. 2. Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации GSNO.

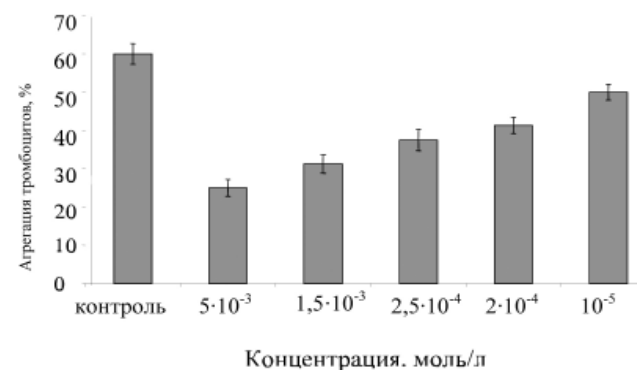


Рис. 3. Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации GTN.

Инкубация тромбоцитов с GSNO в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-6} моль/л привела к значительному ингибированию агрегации тромбоцитов (рис. 2). Наибольший эффект зафиксирован для концентрации, равной 10^{-5} моль/л. С уменьшением концентрации от 10^{-7} до 10^{-9} моль/л ингибирующее действие нитрозотиола понижается. В образце, содержащем 10^{-9} моль/л GSNO, агрегация тромбоцитов возросла на 9%, что может указывать либо на недостаточное количество высвобождаемого NO, необходимого для ингибирования изучаемой функции в данных условиях, либо на его цитотоксическое действие, обусловленное образованием пероксинитрита.

Достаточно хорошо изучен метаболизм органических нитратов в гладкомышечных клетках, сопряженный с их превращением в диоксид азота и затем в нитрозотиол. Высвобождающийся из нитрозотиолов NO ингибирует активацию тромбоцитов [9]. При исследовании TNG в диапазоне концентраций от 10^{-3} до 10^{-5} моль/л обнаружено выраженное дозозависимое ингибирование агрегации тромбоцитов здоровых доноров. Однако эффективная концентрация TNG ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на несколько порядков выше, чем GSNO ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л), что может являться одной из причин проявления цитотоксического эффекта высвобождаемого NO из TNG в условиях окислительного стресса [10].

Выводы

Результаты изучения влияния S-нитрозоглутатиона и тринитроглицерина на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* свидетельствуют о более выраженной антиагрегантной активности S-нитрозоглутатиона, по сравнению с тринитроглицерином.

Литература

1. Bode-Boger S.M. Organic nitrates in cardiovascular disease / S.M Bode-Boger, G. Koida // Cell. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 51, №3. – P. 307–320.
2. Anderson R.A. Platelet nitrate responsiveness in fasting and postprandial type 2 diabetes / R.A. Anderson, G.R. Ellis, L.M. Evans // Diab. Vasc. Dis. Res. – 2005. – №2. – P. 88–93.
3. Ignarro L.J. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates / L.J. Ignarro, H. Lippton, J.H. Edwards // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1981. – №218. – P. 739–749.
4. De Belder A.J. Effect of S-nitrosoglutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation / A.J. De Belder, R. M. Allister, M.W. Radomski // Cardiovascular Research. – 1994. – №28. – P. 691–694.
5. Hebert D. Nitroglycerin rebound associated with vascular, rather than platelet, hypersensitivity / D. Hebert, J.Y. Lam // J. Am. Coll. Cardiol. – 2000. – Vol. 36, №7. – P. 2311–2316.
6. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Вып. 63, №7. – С. 924–938.
7. Stamler J.S. Capillary zone electroforetic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives / J.S. Stamler, J. Loscalzo // Anal. Chem. – 1992. – Vol. 64, №7. – P. 779–785.
8. Долманова И.Ф. Кинетический метод определения микроколичеств тринитроглицерина / И.Ф. Долманова, Г.А. Золотова, О.В. Каменцева, Н.В. Королева // Ж. аналит. химии. – 1983. – Т. 38, №8. – С. 1484–1488.
9. Tian Y. A hypothesis on the metabolism of gluceryl trinitrate in vascular endothelial cells / Y. Tian, C. Zang, Z. Fang, W.N. Betts // Clin. Chim. Acta. – 2001. – Vol. 313, №1–2. – P. 51–57.
10. Fink B. Association between vascular tolerance and platelet upregulation: comparison of nonintermittent administration of pentaerythrityltetranitrate and glyceryltrinitrate / B. Fink, E. Bassenge // Cardiovasc. Pharmacol. – 2003. – V. 41, №30. – P. 498.

Сведения об авторах:

Горбунова Н.И., ст. лаборант каф. физической и коллоидной химии НФаУ.

Блажеевский Н.Е., д. хим. н., профессор каф. физической и коллоидной химии НФаУ.

Адрес для переписки:

Горбунова Наталья Ивановна. 61168, г. Харьков, ул. Блюхера, 4.

Тел.: (0572) 67 98 38.