

Dušikov oksid III: zaviralci prekomernega nastajanja

Nitric oxide III: inhibitors of excessive formation

Janez Mravljak, Barbara B. Byrne Habič, Slavko Pečar

POVZETEK: Dušikov oksid lahko zaradi svoje radikalske narave pri povišanih koncentracijah povzroči številna obolenja in poškodbe tkiva na mestu prekomernega nastanka. NO sintaze – družina encimov, ki katalizirajo pretvorbo arginina do NO in citrulina, so pomembne terapevtske tarče, tako na nivoju vezave substrata in kofaktorjev, kakor tudi na nivoju genske ekspresije. Velik izziv za načrtovanje in razvoj novih zdravil predstavljajo izoformno selektivni inhibitorji NO sintaz.

Ključne besede: dušikov oksid, zaviralci NO sintaze, analogi L-arginina.

ABSTRACT: Due to its radical nature nitric oxide can cause many illness and injuries of tissue by elevated concentrations at the site of its excessive formation. NO synthases – family of enzymes that catalyze conversion of arginine to NO and citrulline, are important therapeutic targets at the level of binding of substrate and cofactors as well as at the level of gene expression. Isophormically selective inhibitors of NO synthases represent considerable challenges for drug development.

Key words: nitric oxide, inhibitors of NO synthase, analogues of L-arginine.

1 Uvod

V prvem strokovnem članku o dušikovem oksidu (1) smo predstavili kemizem in radikalsko naravo dušikovega oksida (NO) v organizmu, v drugem strokovnem članku (2) pa smo podrobneje obravnavali njegove biološke učinke in učinkovine, ki sproščajo NO v *in vivo* pogojih. V tem prispevku pa bomo predstavili prijemališča in razvoj nekaterih selektivnih inhibitorjev NO sintaz (NOS) kot potencialnih zdravilnih učinkovin pri preprečevanju in zdravljenju obolenj oziroma poškodb povezanih s prekomernim nastajanjem NO.

Družina NOS obsega pri sesalcih tri izoformne oblike, ki so jih poimenovali po lastnostih oziroma tipu celic v katerih so jih prvič opisali: endotelijska NOS (eNOS), nevronska NOS (nNOS) in inducibilna NOS (iNOS) (3). Fiziološka vloga NO je določena predvsem z izoformno obliko NOS, ki ga tvori; lahko nastopa kot medcelični mediator ali kot citotoksični agens v imunskem sistemu. S prekomerno tvorbo NO v določenih okoliščinah pa lahko NOS povzročijo poškodbe tkiva pri številnih obolenjih. V teh primerih bi lahko dosegli terapevtsko ugodne učinke s selektivno inhibicijo iNOS in nNOS, medtem ko je dolgotrajna inhibicija eNOS vsekakor škodljiva.

2 Zaviranje prekomernega nastajanja NO

Povečana lokalna koncentracija NO ob hkratni prisotnosti drugih reaktivnih kisikovih in dušikovih vrsti dokazano povzroči okvare v vsakem tkivu (1, 3). Prekomerno izražanje iNOS so opazili pri modelih sep-

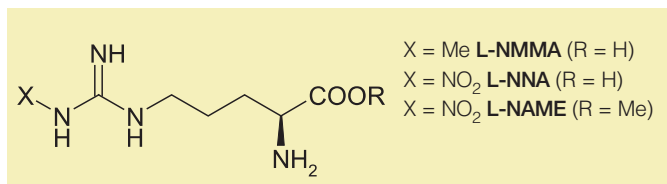
tičnega šoka, pri vseh vnetjih, astmi in v možganih po ishemiji ali travmi. V številnih neurodegenerativnih obolenjih kot so Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza, Parkinsonova bolezen ter pri avtoimunih obolenjih (celiakija, artritis) ima iNOS pomembno vlogo (4). Žal iNOS ni edini vzrok za porast NO. Opisali so tudi prekomerno aktivnost nNOS. Dokazali so, da se z N-metil-D-aspartatom (NMDA) inducirana neurotoksičnost zmanjša ob sočasni uporabi zaviralcev NOS in da so pri miših z okvarjeno nNOS poškodbe zaradi kapi blažje (5). Znano je, da NO sintaze lahko v nekaterih okoliščinah tvorijo tudi superoksidni radikal, neodvisno od tvorbe NO. Za nNOS ugotavljajo, da najlažje tvori superoksidni radikal, ko sta koncentraciji tetrahidrobiopterina (kofaktor) ali arginina (substrat) nizki, pa tudi ob prisotnosti zaviralcev podobnim argininu (6). Z omejitvijo prekomernega nastajanja NO lahko pričakujemo določene terapevtske učinke. Glavni problemi so specifičnost zaviranja samo določenega tipa NOS v določenih tkivih, še zlasti so terapevtsko zanimivi zaviralci iNOS in nNOS. Njihov razvoj je v središču današnjih raziskav. Po mehanizmu delovanja so zaviralci NOS:

- analogi arginina,
- zaviralci dimerizacije NOS,
- zaviralci kofaktorjev NOS in
- zaviralci, ki delujejo po drugih mehanizmih.

2. 1 Zaviralci podobni L-argininu

L-arginin (L-Arg) v visokih koncentracijah (nad 100 μM) zavira eNOS. Učinek je posledica njegove vezave na alosterično mesto NOS in s tem ovirana vezave L-Arg na aktivno mesto encima. Prvi znani zavi-

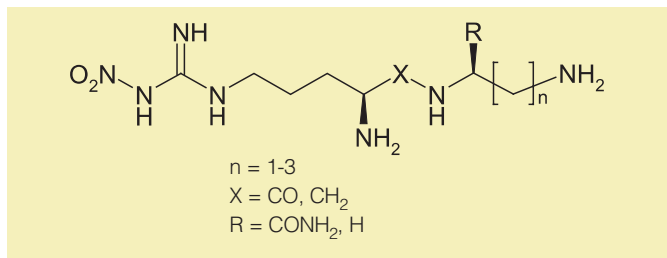
ralci so bili preprosti analogi L-Arg, npr.: N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) in njegov metilni ester (L-NAME) (7, 8, 9) (slika 1). Čeprav so si spojine strukturno podobne, zavirajo NOS na različne načine.



Slika 1: Prvi opisani zaviralci NOS: N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) in njegov metilni ester (L-NAME).

Figure 1: First known inhibitors of NOS: N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) and its methyl ester (L-NAME).

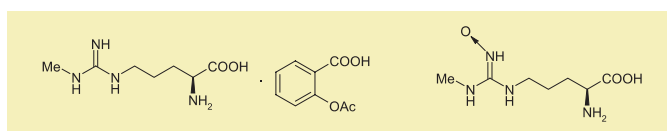
L-NMMA, ki je izoformno nespecifičen inhibitor, uporaben v raziskovalne namene, pretvori encim v *N*-hidroksi-*N*-metil-L-arginin. Pri tem nastane H_2O_2 , ki ireverzibilno okvari encim. V majhnih odmerkih ima L-NMMA ugodne učinke pri terapiji septičnega šoka, glavobola ter astme. Zmanjša tudi vnetje kože, povzročene z ultravijolično svetlobo (3, 6). L-NNA pa spremeni konformacijo aktivnega mesta NOS in prepreči vezavo L-Arg. Tovrstni zaviralci se vežejo na NOS počasi in počasi tudi disociirajo (10). Po vzoru *N*-nitroarginina (L-NNA) so pripravili analoge, ki so selektivni inhibitorji nNOS (11, 12) (slika 2).



Slika 2: Peptidni in neamidni analogi L-NNA kot selektivni inhibitorji nNOS.

Figure 2: Peptide and nonamide analogues of L-NNA as selective inhibitors of nNOS.

Sol L-NMMA in acetilsalicilne kisline (slika 3) je kombinacija dveh neselektivnih inhibitorjev encimov: NOS in ciklooksigenaze. V kliničnih testiranjih (6) jo preizkušajo za zdravljenje revmatoidnega artritisa, kardiovaskularnih motenj in motenj v cerebralni cirkulaciji.

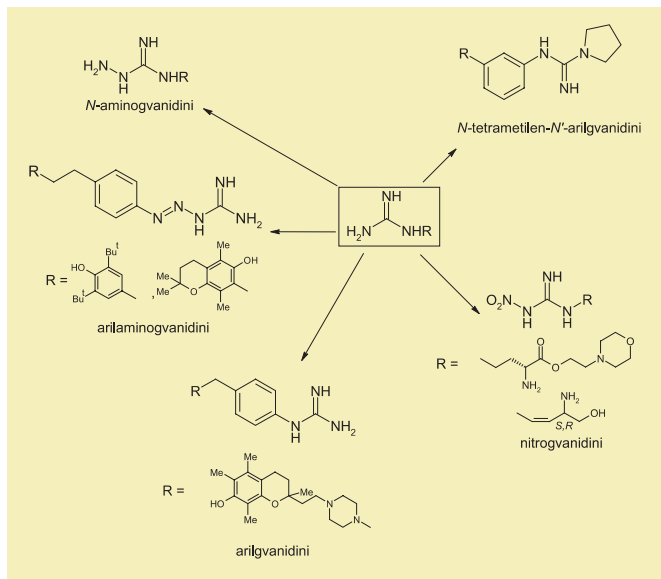


Slika 3: Sol L-NMMA in acetilsalicilne kisline in *N*-oksid L-NMMA.

Figure 3: Salt of L-NMMA and acetylsalicylic acid and *N*-oxide of L-NMMA.

Ugotovili so da z majhnimi spremembami v argininskem delu povečamo selektivnost bodisi v smeri iNOS ali nNOS. *N*-oksid L-NMMA (slika 3) je učinkovit zaviralec iNOS, ki zavre tvorbo NO po stimulaciji z lipopolisaharidi. Zamenjava metilne skupine pri L-NMMA s propilno (*N*-propil-L-Arg) ali ciklopropilno (*N*-ciklopropil-L-Arg) pa da selektivnejši nNOS zaviralec (6).

Številni analogi arginina, citrulina, tiocitrulina in njihovih derivatov so pretežno kompetitivni zaviralci nNOS. Te spojine preprečijo tudi tvorbo reaktivnih kisikovih spojin in bi bile lahko uporabne proti hipotenziji, žveplo vsebujoči derivati pa pri terapiji artritisa, migrene in postoperativnega ileusa (3, 6).



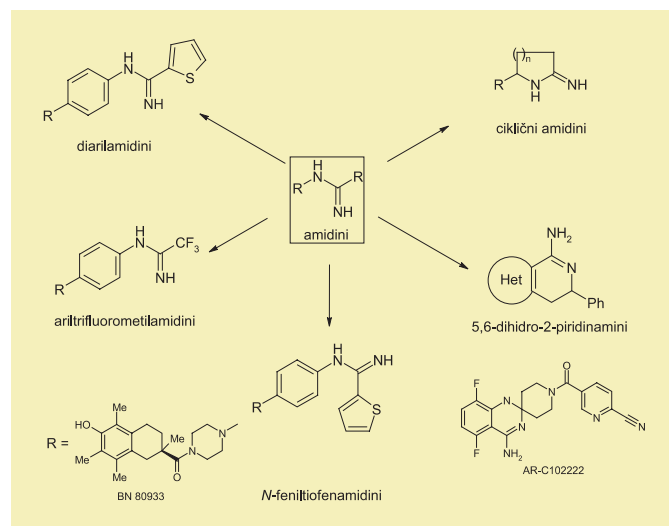
Slika 4: Derivati gvanidina kot zaviralci NOS

Figure 4: Guanidine derivatives as NOS inhibitors

Med arilaminogvanidini in arilgvanidini (slika 4) so našli selektivne zaviralce iNOS, ki bi bili uporabni za zdravljenje septičnega šoka, hipotenzije, revmatoidnega artritisa, ulceroznega kolitisa in od insulina odvisnega diabetesa (3, 6). Zanimiv je poskus združitve antioksidanta (derivat vitamina E) in zaviralca NOS (Slika 4, arilgvanidinski derivat) v eno molekulo, ki istočasno zavira lipidno peroksidacijo in nastajanje NO s približno enako učinkovitostjo (13). Za derivate *N*-tetrametilen-*N'*-arilgvanidinov so ugotovili, da bi bili lahko kot selektivni zaviralci nNOS (14, 15) (Slika 4) učinkoviti pri terapiji nevrodegenerativnih bolezni, izboljšanju krčenja želodca in pri vnetnih obolenjih. Proučujejo tudi uporabnost nitrogvanidinov, ki so zaviralci nNOS in iNOS pri zdravljenju kardiovaskularnih bolezni, motnjah cerebralne cirkulacije, aterosklerozi, diabetesu in sepsi.

Za amidine (slika 5) so ugotovili, da so selektivni zaviralci nNOS. Med njimi iščejo učinkovine za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (6).

Tudi med *S*-substituiranimi izotiosečinami so učinkoviti inhibitorji NOS (3, 6, 16) (Slika 6). Podobno kot L-NMMA, te spojine poškodujejo okolico hema NOS in tako preprečijo interakcijo encima s sub-

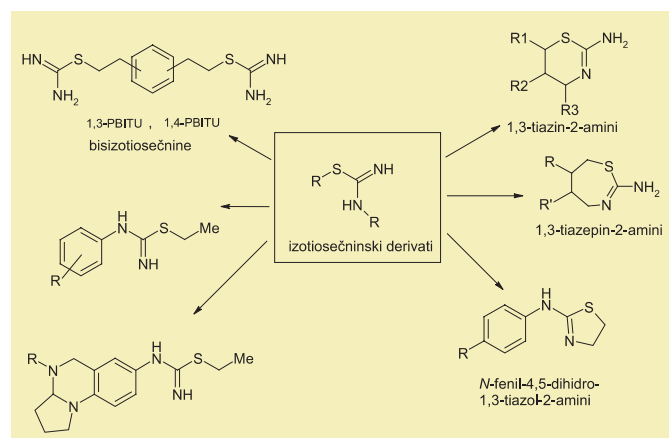


Slika 5: Derivati amidina
Figure 5: Amidine derivatives

stratom. S-alkil izotiosečnine so učinkovitejši zaviralci, kot derivati arginina. Zaradi žveplovega atoma, ki ima veliko afiniteto do hema je S-metilizotiosečnina 500 krat učinkovitejši zaviralec iNOS, kot N-metil-L-arginin. Med S-alkil izotiosečninami so tudi selektivni inhibitorji nNOS, ki imajo terapevtski potencial pri zmanjševanju poškodb nevronov ob možganski kapi in drugih nevrodegenerativnih obolenjih. Bis-izotiosečnine (1,3-PBITU, 1,4-PBITU; slika 6) kot prvi selektivni zaviralci iNOS, so zaradi nizke biološke uporabnosti in toksičnosti (vpliva na Na⁺/K⁺ ATPazo) neuporabni.

S študijem vezave ligandov na NOS so prišli do treh značilnosti, ki jih mora imeti izoformno selektivni zaviralec (3, 16):

-na ogrodju mora biti gvanidinska, amidinska ali (tio)sečninska skupina, ki lahko tvori vodikovo vez z glutamatno stransko verigo v aktivnem mestu NOS. Prisotnost manjše hidrofobne skupine (alkilna ali tienilna) je ugodna, ker omogoča dodatno hidrofobno interakcijo;

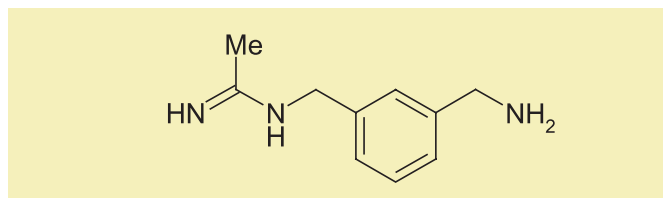


Slika 6: Izotiosečninski derivati
Figure 6: Isothiourea derivatives.

-zaviralec mora imeti funkcionalno skupino, ki zagotavlja izoformno selektivnost z možnostjo tvorbe primerne vzorca vodikovih vezi. S to skupino izkoriščamo razlike v aminokislinah med posameznimi izoformami v kanalu, po katerem pride substrat do aktivnega mesta;

-zaviralec mora imeti distančnik med obema deloma, ki je primerno dolg in gibljiv, da doseže izoformno specifična področja.

Kljub veliki podobnosti arginin vezavnih mest pri izoenzimih NOS so razvili visoko selektivne inhibitorje. Naj omenimo 1400W (slika 7), ki je 10000 krat selektivnejši pri zaviranju iNOS kot eNOS in 30 krat selektivnejši glede na nNOS (3, 6, 17). Kljub ugodni učinkovitosti in selektivnosti pa je 1400W preveč toksična spojina, da bi jo uporabljali.



Slika 7: Kemična struktura 1400W
Figure 7: Chemical structure of 1400W

2. 2 Zaviralci dimerizacije NOS

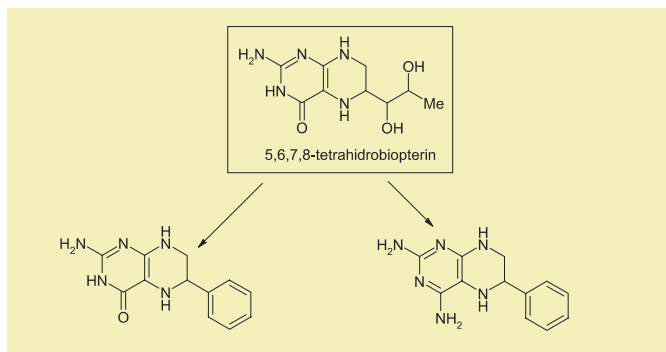
Vse izoformne oblike NOS postanejo katalitično aktivne šele, ko dimerizirata dve podenoti encima (3). Na nastajanje NO vplivamo tudi tako, da oviramo nastanek aktivnega dimeru NOS iz monomernih enot. Opisani so derivati imidazolov, ki ob vezavi na hem v monomeru iNOS motijo eno od vijačnic monomera tako, da spremenijo strukturo vezavnega mesta za arginin (18). Inhibitor-monomer kompleks tako ne more tvoriti niti arginin- niti tetrahydrobiopterin vezavnega mesta. Opisane lastnosti imajo tudi protiglivične učinkovine: klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, ki poleg tega preprečujejo vezavo kalmomodulina na iNOS. Kot zanimivi so se izkazali pirimidinimidazoli, med 2-aminopiridini pa so že našli številne relativno selektivne iNOS in nNOS inhibitorje (6).

2. 3 Zaviralci kofaktorjev NOS

Za encimsko aktivnost NOS so potrebni kofaktorji (6R)-5,6,7,8,-tetrahydrobiopterin (BH₄), flavinadenin dinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), železov protoporfirin IX (hem) in kalmodulin, ki se vežejo na svoja vezavna mesta na aktiviranem dimeru NOS (3). Zaviralci vezave flavina in kalmomodulina so že dolgo znani, toda zaradi nezmožnosti doseganja selektivnosti so neuporabni. Večjo pozornost posvečajo snovem, ki zavirajo vezavo tetrahydrobiopterina. Kofaktor (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin maksimalno aktivira vse tri NOS in stabilizira kvarterno strukturo encima. S pomočjo 3D-modela postavljenega s poznavanjem kvantitativnega odnosa med strukturo in delovanjem (3D-QSAR) so določili strukturne zahteve za zaviranje nNOS: 4-okso- in 4-aminopteridini (slika 8) zavirajo nNOS desetkrat selektivneje kot ostale NOS (19).

2. 4 Drugi zaviralci

Našli so tudi endogene peptide in proteine, ki se vežejo na izoforme NOS in zavirajo njihovo aktivnost (3). nNOS inhibira 89 aminokislin dolg protein, imenovan protein inhibitor NOS (PIN), ki se veže na N-termi-



Slika 8: 4-okso- in 4-aminopteridinski inhibitor izpeljana iz strukture kofaktorja 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

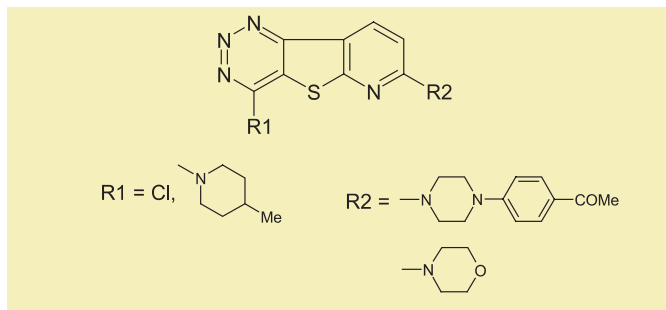
Figure 8: 4-oxo- and 4-aminopteridine inhibitors derived from the structure of cofactor 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine

nalni konec encima. Odkrili so tudi druge inhibitorne domene na eNOS in nNOS, ki bi lahko bile tarčna mesta za selektivno inhibicijo. Tako *in vivo* aplikacija ogrodne domene kaveolina-1 inhibira eNOS aktivnost, kar potrjuje, da utegne biti ta pristop uporaben.

V literaturi je opisanih veliko učinkovin (tako endogenega kot ekso-genega izvora), ki vplivajo na ekspresijo inducibilne NO sintaze (iNOS) (20). Del učinka uveljavljenih glukokortikoidov, je posledica zaviranja transkripcije gena za iNOS. Obetajoča učinkovina, ki je v fazi kliničnega testiranja, je analog heptapeptida α -melanocite stimulirajočega hormona (6, 21). Ta analog zavira izražanje številnih ključnih citokinov, kot so interleukini -1 β , -6 in -10 in TNF- α , kakor tudi iNOS. Poznani so tudi piridotienotriazinski derivati, ki nespecifično zavirajo izražanje iNOS in ciklooksigenaz (COX-1 in COX-2), vendar še ni povsem jasno, ali bo mogoče doseči selektivno zaviranje transkripcije gena za iNOS (6). Podobno ni jasno, ali bo možno doseči povečanje ekspresije gena za eNOS. (Slika 9)

3 Sklep

Poleg znanih donorjev dušikovega oksida, ki jih že vrsto let uspešno uporabljamo v terapiji in katerih delovanje so pojasnili z odkritjem vloge NO v telesu, raziskovalci iščejo in preizkušajo nove zdravilne učinkovine, z drugačnimi mehanizmi sproščanja NO, ki bi lahko delo-



Slika 9: Piridotienotriazinski derivati kot nespecifični zaviralci ekspresije iNOS in ciklooksigenaz.

Figure 9: Pyridothienotriazine derivatives as nonspecific inhibitors of iNOS and cyclooxygenases expression.

vale na želena tarčna mesta in učinkovine, ki bi uravnemale nastajanje NO. Dejstvo, da ima NO v mnogih patofizioloških procesih večplastno vlogo, otežuje odkritje zaviralcev iNOS in nNOS, ki bi učinkovito posegli v uravnavanje nastajanja NO in s tem v doseganje želenega učinka brez neugodnih posledic. V prednosti bodo učinkovine, ki bodo tkivno selektivne ter specifične za posamezno izomorfno obliko NOS, pri čemer pa je že sedaj znano, da je primernejša delna inhibicija sintaze NO od popolne.

Glede na vpletenost NO v številne procese v telesu, je pred raziskovalci velik izziv pri načrtovanju takih učinkovin, ki bodo uravnemale le določene procese, zato verjetno ne moremo pričakovati kmalu velikih preobratov na tem področju. Velik napredek bo, če bo uspelo dostavljati izbran zaviralec določene izomorfne oblike NOS v določeno tkivo. V tem primeru pa lahko pričakujemo velike spremembe pri mnogih obolenjih, ki jih danes nemočno opazujemo.

4 Literatura

1. Byrne Habič B, Mravljak J, Pečar S. Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. *Farm Vestn* 2004; 55: 283-291.
2. Mravljak J, Byrne Habič B, Pečar S. Dušikov oksid I: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO. *Farm Vestn* 2005; 56: 11-16.
3. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why?. *Drug Discov Today* 2002; 1: 939-950.
4. Hobbs A J, Higgs A, Moncada S. Inhibition of Nitric Oxide Synthase as a Potential Therapeutic Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:191-220.
5. Bird D C, Bujas-Bobanovic M, Robertson H A et al. Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase. *Psychopharmacology* 2001; 155: 299-309.
6. Granik V G, Grigor'ev N B. Nitric oxide synthase inhibitors: biology and chemistry. *Russ Chem Bull* 2002; 51: 1973-1995.
7. Peterlin-Masic L, Kikelj D. Arginine mimetics. *Tetrahedron* 2001; 57 (33): 7073-7105.
8. Moore W M, Webber R K, Jerome G M et al. L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine: A Selective Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem* 1994; 37: 3886-3888.
9. Babu B R, Griffith O W. N⁶-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. *J Biol Chem* 1998; 273 (15): 8882-8889.
10. Wolfe M M. Future Trends in the Development of Safer Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am J Med* 1998; 105 (5A): 44S-52S.
11. Huang H, Martásek P, Roman L J et al. Synthesis and Evaluation of Peptidomimetics as Selective Inhibitors and Active Site Probes of Nitric Oxide Synthases. *J Med Chem* 2000; 43: 2938-2945.
12. Hallinan E A, Tsymbalov S, Dorn C R et al. Synthesis and Biological Characterization of L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine 5-Tetrazole-amide, a Prodrug of a Selective iNOS Inhibitor. *J Med Chem* 2002; 45: 1686-1689.
13. Chabrier P E, Auguet M, Spinnnewyn B et al. BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: A promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10824-10829.
14. Beaton H, Hamley P, Nicholls D J et al. 3,4-Dihydro-1-isoquinolinamines: A Novel Class of Nitric Oxide Synthase Inhibitors with a Range of Isoform Selectivity and Potency. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 1023-1026.
15. Beaton H, Boughton-Smith N, Hamley P et al. Tienopyridines: Nitric Oxide Synthase Inhibitors with Potent In Vivo Activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 1027-1030.
16. Raman C S, Li H, Martásek P et al. Implications for Isoform-selective Inhibitor Design Derived from the Binding Mode of Bulky Isothioureas to the Heme Domain of Endothelial Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem* 2001; 276: 26486-26491.
17. Garvey E P, Oplinger J A, Purfine E S et al. 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase *in Vitro* and *in Vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272: 4959-4963.
18. Wolff D J, Datto G A, Samatovicz R A. The Dual Mode of Inhibition of Calmodulin-dependent Nitric-oxide Synthase by Antifungal Imidazole Agents. *J Biol Chem* 1993; 268: 9430-9436.
19. Matter H, Kotsionis P, Klingler O et al. Structural Requirements for Inhibition of the Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS-I): 3D-QSAR Analysis of 4-Oxo- and 4- Amino- Pteridine-Based Inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45: 2923-2941.
20. Rao K M K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Env Heal B* 2000; 3(1): 27-58.
21. Annual Drug Data Report series. Ed J R Prous, Prous Science, S A, Barcelona-Philadelphia 1998, 20: 45.