

ПЛЕЙОТРОПНОСТЬ СТАТИНОВ. ИМЕЮТСЯ ЛИ ВОЗМОЖНОСТИ ОБЪЯСНЕНИЯ ФЕНОМЕНА?

И.А. Латфуллин*, Л.Ф. Галиуллина, И.З. Рахматуллин, В.В. Клочков, А.В. Аганов

Казанский Федеральный университет, Институт физики. 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

В данной работе выдвигается гипотеза, что возможные особенности в проявлении плеiotропности статинов могут быть связаны, в частности, с различиями их взаимодействия с клеточной мембраной. С помощью метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса были исследованы молекулярные комплексы правастатина и симвастатина с моделями клеточных мембран. Было показано, что правастатин взаимодействует практически только с поверхностью мембраны и поэтому для его проникновения внутрь клетки требуется активная транспортная система, симвастатин же локализуется внутри модельной клеточной мембраны, поэтому может пассивно проникать в клетки организма. Возможно, эти различия и обуславливают разные проявления плеiotропности данных статинов.

Ключевые слова: статины, плеiotропные эффекты, ядерный магнитный резонанс.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2015;11(6):634-637

Pleiotropic effects of statins. Are there opportunities to explain of the phenomenon?

I.A. Latfullin*, L.F. Galiullina, I.Z. Rakhmatullin, V.V. Klochkov, A.V. Aganov

Kazan Federal University, Institute of Physics. Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008, Russia

A hypothesis that possible pleiotropic features of different statins could be explained by distinctions in their interaction with cell membrane is suggested. Molecular complexes of pravastatin and simvastatin with model of cell membrane were studied by method of nuclear magnetic resonance spectroscopy. It was shown that pravastatin interacts almost exclusively with a surface of cell membrane and, therefore active transport system is needed to deliver pravastatin into the cell. In contrast, simvastatin is located in the inner part of model cell membrane. That's why it can passively penetrate into organism cells. Perhaps, these differences lead to distinctions of pleiotropic properties of these statins.

Keywords: statins, pleiotropic effects, nuclear magnetic resonance.

Ration Pharmacother Cardiol 2015;11(6):634-637

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): IALatfullin@kpfu.ru

Введение

В настоящее время статины (ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзима-редуктазы) – наиболее распространенные препараты для борьбы с гиперхолестеринемией, одним из основных факторов риска развития атеросклероза. Их эффективность была продемонстрирована в широко известном исследовании 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) [1].

Наряду с гипополипидемическим действием статинов (снижение содержания холестерина и липопротеинов низкой плотности, повышение уровня липопротеинов высокой плотности, снижение уровня триглицеридов) обнаруживаются плеiotропные (нелипидные) свойства, основными из которых являются улучшение функции эндотелия, подавление воспалительной активности в сосудистой стенке, снижение агрегации тромбоцитов и пролиферативной активности гладкомышечных клеток, а также ряд других свойств, механизмы которых недостаточно изучены [2]. При этом отмечается, что их плеiotропные эффекты могут суще-

ственно различаться. Подтверждением этого является работа [3], в которой было выявлено разнонаправленное действие аторвастатина и правастатина на фактор Виллебранда: повышение в случае применения правастатина и понижение при использовании аторвастатина. Со времени той публикации прошло много лет, однако в доступной нам литературе мы не обнаружили объяснения этому феномену.

В нашей работе выдвигается гипотеза, что возможные особенности в проявлении плеiotропности статинов могут быть связаны, в частности, с различиями их взаимодействия с клеточной мембраной. Для обоснования предположения был использован метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения – наиболее эффективный метод для целей структурно-динамического анализа в растворах. В качестве объектов исследования были выбраны используемые в клинической практике статины: правастатин и симвастатин, сходные по химической структуре, но отличающиеся по своим плеiotропным свойствам [4]. Симвастатин является лактоном и не активен до тех пор, пока в результате биохимических процессов, происходящих в печени, не раскроется циклическое кольцо (рис. 1,б) и не образуется оксикислота. Кроме того, молекула симвастатина имеет в алифатической цепи синтетически введенную дополнительную метильную группу CH_3 -23 (рис. 1,б). В отличие от симвастатина правастатин изначально представляет собой оксикислоту. Модельными мембранами служили мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН).

Сведения об авторах:

Латфуллин Ильдус Анварович – д.м.н., профессор кафедры медицинской физики, Институт физики КФУ

Галиуллина Лейсан Фаритовна – к.ф.-м.н., доцент той же кафедры

Рахматуллин Ильфат Зуфарович – м.н.с.

научно-исследовательской лаборатории ЯМР-структура, Институт физики КФУ

Клочков Владимир Васильевич – д.х.н., профессор кафедры медицинской физики, Институт физики КФУ

Аганов Альберт Вартанович – д.х.н., профессор, заведующий той же кафедрой

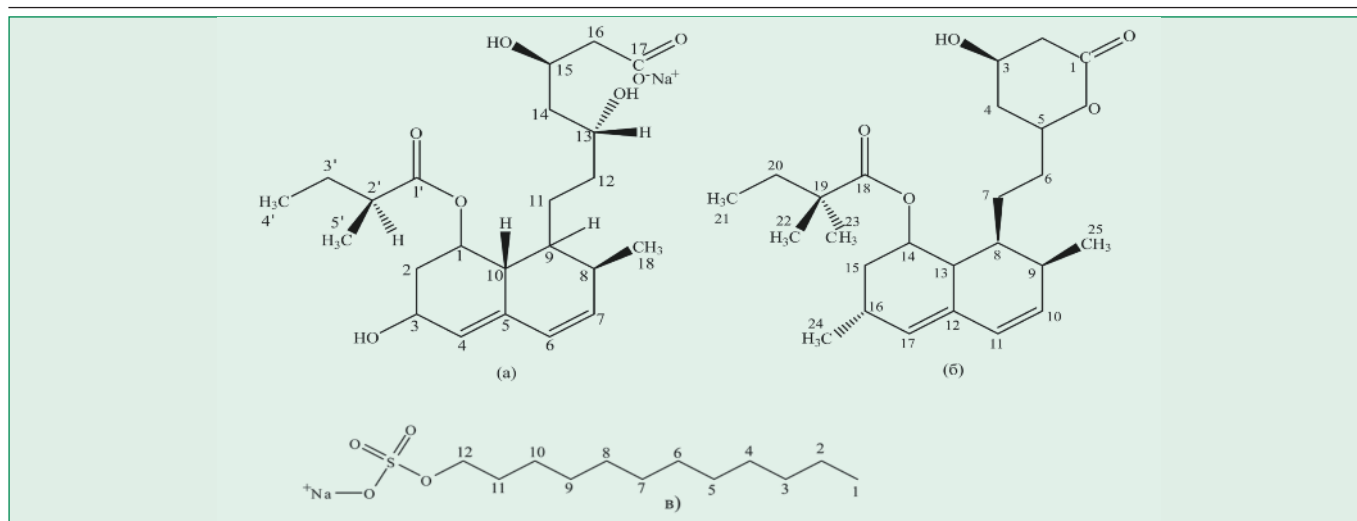


Рисунок 1. Химические структуры правастатина (а), симвастатина (б), додецилсульфата натрия (в)

Материал и методы

Правастатин и симвастатин были приобретены в Sigma-Aldrich Rus (Москва, Россия) и использованы без дополнительной очистки (степень очистки правастатина >98%, симвастатина >97%). Для ЯМР экспериментов были приготовлены растворы веществ в D_2O (с замещением 99%) с концентрацией 6 г/л с добавлением ДСН с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования (23 ммоль/л), приготовленные непосредственно в стандартных 5 мм ампулах (XR-55). Объем каждого из образцов – 500 мкл.

Спектры ЯМР были записаны на импульсном ЯМР спектрометре с Фурье-преобразованием Bruker Avance 500 с частотой 1H 500,13 МГц, ^{13}C 125,758 МГц с использованием с 5 мм z-градиентного инверсного датчика при температуре 303 ($\pm 0,1$) К. Химические сдвиги 1H отсчитывали от соответствующих линий остаточных протонов растворителя H_2O (δ 1H 4,72 м.д.). 1H ЯМР спектры записаны с использованием 90° импульсов длительностью 7,0 мкс и задержкой между импульсами 2 с; ширина спектра $sw=9,4$ м.д. Полное отнесение 1H ЯМР спектров произведено с использованием 2D COSY, HSQC и HMBC экспериментов. Точность в измерении химических сдвигов 1H составляла $\pm 0,01$ м.д. Структура молекулярных комплексов исследовалась с помощью экспериментов 2D NOESY. Время между двумя накоплениями NOESY спектров было не менее, чем в три раза длиннее времени продольной релаксации T_1 для молекул ДСН и статинов.

Результаты

На рис. 1 приведены химические структуры правастатина и симвастатина и додецилсульфата натрия.

Химические структуры правастатина и симвастатина были подтверждены одномерными 1H и ^{13}C , и двумерными ЯМР экспериментами. Сигналы в спектре ЯМР 1H были отнесены с использованием двумерных

экспериментов, таких как 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C HSQC и 1H - ^{13}C HMBC.

Чтобы исследовать расположение молекул правастатина и симвастатина в модельной мембране, были проведены 2D NOESY ЯМР эксперименты (рис. 2,3).

Обсуждение

Ранее группой Mason и соавт. высказывалось предположение, что особенности в фармакологических свойствах статинов могут объясняться различиями в их взаимодействии с клеточной мембраной [5]. Однако исследования этой группы проводились методом рентгеновского дифракционного анализа, соответственно, для твердых образцов, и поэтому их результаты не могут быть достоверно применены к организму человека, где все процессы происходят в жидкой среде – растворах. Одной из наиболее эффективных

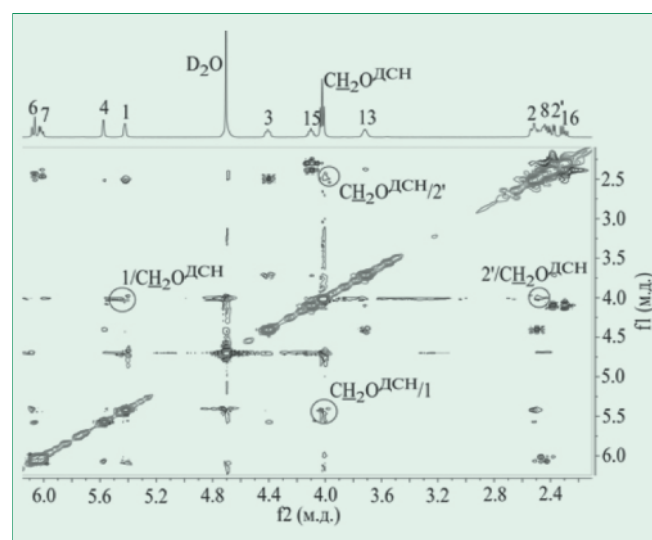


Рисунок 2. 2D NOESY ЯМР спектр правастатина в растворе D_2O +мицеллы додецилсульфата натрия при 303К. Время смешивания $\tau_m=50$ мс (пояснения в тексте)

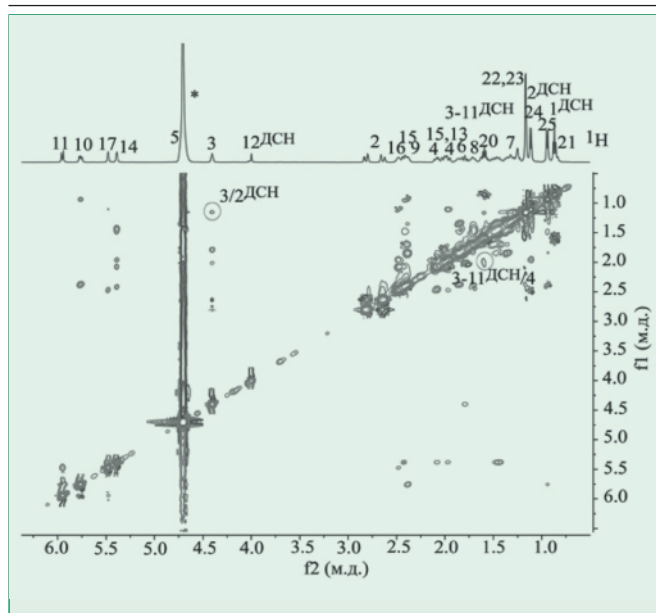


Рисунок 3. 2D NOESY ЯМР спектр симвастатина в растворе D_2O +мицеллы додецилсульфата натрия при $T=303K$. Время смешивания $\tau_m=100$ мс (пояснения в тексте)

ных методик ЯМР для исследования пространственного строения молекул и молекулярных комплексов в растворе является спектроскопия 2D NOESY. Недиагональные кросс-пики в таком двумерном спектре соответствуют ядерным эффектам Оверхаузера, возникающим между близко расположенными ядрами (<50 нм) или ядрами, находящимися в химическом обмене. Однако непосредственное исследование структуры клеточных мембран с помощью метода ЯМР затруднено, поскольку время протонной релаксации для фосфолипидных агрегатов оказывается слишком малым в шкале ЯМР химических сдвигов ($<10^{-6}$ с), что приводит к сильному уширению линий в спектрах и затрудняет их анализ. В связи с этим в данной работе взаимодействие

статинов с поверхностью клеточной мембраны исследовалось на модельных мембранах, в качестве которых были выбраны мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) (рис. 1, в), в последние годы часто применяемые в подобных исследованиях [6-11]. В отличие от фосфолипидов, которые формируют бислои и мультислои в водных растворах, молекулы додецилсульфата натрия в растворах способны формировать мицеллы – относительно небольшие агрегаты сферической формы, распределенные по всему раствору [12]. Наличие у ДСН полярной гидрофильной головной группы и гидрофобного «хвоста» по аналогии с фосфолипидными молекулами делает ДСН подходящей модельной системой для изучения взаимодействия различных составляющих клеточных мембран, в том числе холестерина, с фосфолипидными мембранами.

2D NOESY спектры правастатина (рис. 2) и симвастатина (рис. 3) содержат несколько кросс-пигов с сигналами мицелл ДСН. При этом в спектре на рис. 2 наблюдаются эффекты Оверхаузера между протонами правастатина и протонами группы CH_2O ДСН, близкими к полярной части молекул, образующей поверхность модельной мембраны. В то же время в спектре на рис. 3 имеются кросс-пики между сигналами симвастатина и сигналами протонов ДСН гидрофобного «хвоста» (CH_2-2 , $CH_2-(3-11)$), которые расположены внутри мицелл и имитируют внутреннюю часть клеточной мембраны. Таким образом, можно сделать вывод, что правастатин локализуется практически только на поверхности клеточной мембраны за счет взаимодействия кислородных атомов правастатина с полярной частью молекул ДСН. В отличие от него симвастатин, по-видимому, проникает во внутреннюю часть клеточной мембраны, располагаясь между гидрофобными «хвостами» ДСН. Это объясняет, почему правастатин не может пассивно проникать внутрь клетки, в отличие от сим-

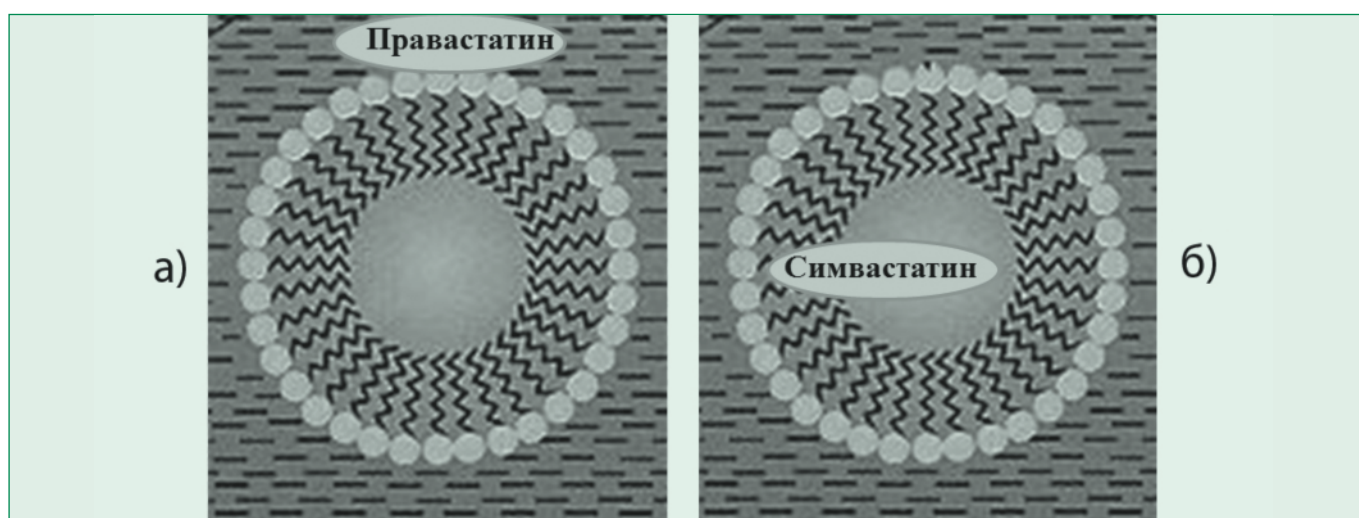


Рисунок 4. Схематическое изображение структуры комплексов правастатина (а) и симвастатина (б) с мицеллами додецилсульфата натрия

вастатина, и может служить ключом к пониманию отличий в их плейотропности. Расположение исследованных статинов в модельной клеточной мембране схематично представлено на рис. 4.

Вероятно, правастатин образует комплекс с поверхностью модельной мембраны путем электростатического взаимодействия частично отрицательно заряженных атомов кислорода, связанных с алифатическими цепочками, с ионами Na^+ и с полярными группами «головной» части молекул ДСН. Симвастатин же является электрически нейтральной молекулой, поэтому способен проникать внутрь мицеллы за счет гидрофобных взаимодействий.

Заключение

ЯМР исследования молекулярных комплексов правастатина и симвастатина с модельными мембранами показали, что молекулы статинов могут отличаться

расположением в клеточной мембране. Правастатин взаимодействует практически только с поверхностью мембраны и поэтому для его проникновения внутрь клетки требуется активная транспортная система, симвастатин же локализуется внутри модельной клеточной мембраны, поэтому может пассивно проникать в клетки организма. Возможно, это обуславливает различие в проявлении плейотропности рассмотренных статинов. Мы полагаем, что необходимы дальнейшие исследования с использованием других препаратов этой группы, особенно – влияющих на инсулинорезистентность.

Конфликт интересов. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of Cholesterol lowering in 4444 patients coronary heart disease in Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-9.
2. Aronov DM. Pleiotropic effects of statins. *Kardiologiya* 2008; 8: 60-8. In Russian (Аронов Д.М. Плейотропные эффекты статинов. *Кардиология* 2008; 8: 60-8).
3. Pokrovskaya EV, Gratsianskii NA, Averkov OV, et al. Acute coronary syndrome without ST-segment elevation on ECG: opposite changes of hemostasis with early use of atorvastatin and pravastatin. *Kardiologiya* 2003; 6: 4-13. In Russian (Покровская Е.В., Грацианский Н.А., Аверков О.В., и др. Острый коронарный синдром без подъемов сегмента ST на ЭКГ: разнонаправленные изменения показателей гемостаза при раннем применении аторвастатина и правастатина. *Кардиология* 2003; 6: 4-13).
4. Thomson GR A handbook of hyperlipidemia. London: Current Science; 1989.
5. Mason R.P., Walter M.F., Day Ch.A., Jacob R.F. Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. *The American journal of cardiology* 2005; 96: 11F-23F.
6. Callion L., Lequin O., Khemtémourian L. Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1828: 2091-8.
7. Henry G.D., Sykes B.D. Methods to study membrane protein structure in solution. *Methods Enzymol* 1994; 239: 515-35.
8. Galiullina L.F., Blokhin D.S., Aganov A.V., Klochkov V.V. Investigation of cholesterol+model of biological membrane complex by NMR spectroscopy. *MRSej* 2012; 14: 12204-10.
9. Novotna P., Goncharova I., Urbanova M. Mutual structural effect of bilirubin and model membranes by vibrational circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1838: 831-41.
10. Usachev K.S., Filippov A.V., Filippova E.A., et al. Solution structures of Alzheimers amyloid A β 13-23 peptide: NMR studies in solution and in SDS. *J Mol Struct* 2013; 1049: 436-40.
11. Galiullina L.F., Rakhmatullin I.Z., Klochkova E.A., et al. Structure of pravastatin and its complex with sodium dodecyl sulfate micelles studied by NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in chemistry* 2015; 53(2): 110-4.
12. Wang G., Keifer P., Peterkofsky A. Solution structure of the N-terminal amphitropic domain of Escherichia coli glucose-specific enzyme IIA in membrane-mimetic micelles. *Protein Science* 2003; 12: 1087-96.

Поступила: 02.11.2015

Принята в печать: 28.11.2015