Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա, Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении, Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia, Biological Journal of Armenia

Биолог. журн. Армении, 1-2 (**56**), 2004

УДК 577.152.1

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОПТИКО-СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ КРОВИ

СЕРГЕЙ С. АЛЕКСАНЯН

Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

Лекарственные препараты (ЛП), используемые для терапии сердечно-сосудистых заболеваний (строфантин, преднизолон, тринитроглицерин, вурдон и дигоксин), по-разному изменяют оптико-спектральные показатели и биологическую активность металлопротеинов - регуляторов метаболизма активных форм кислорода в крови после четырехдневного инкубирования при 4° растворов этих металлопротеинов (МП) и ЛП в аэробных условиях *in vitro*.

Սիրտ-անոթային հիվանդությունների բուժման ժամանակ օգտագործվող դեղամիջոցները (ստրոֆանտին, պրեդնիզոլոն, տրինիտրոգլիցերին, վուրդոն, դիգոքսին) տարբեր կերպով են փոփոխում արյան մեջ թթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող մետաղապրոտեյինների օպտիկական-սպեկտրալ բնութագրերը և կենսաբանական ակտիվությունը այդ դեղամիջոցների և մետաղապրոտեինների լուծույթների աէրոբ պայմաններում 4 օր 4°–ում ինկուբացման հետևանքով *in vitro*:

The medicinal preparations (strophanthin, prednisolone, trinitroglycerin, vurdon, digoxin) which are used during therapy of the cardio-vascular diseases charge differently the optical-spectral characteristics and biological activity of metalloproteins – the regulators of metabolism of reactive oxygen species after incubation of solutions of these metalloproteins and medical preparations in aerobic conditions during 4 days at 4° *in vitro*.

Металлопротеины - лекарственные препараты - активный кислород

Лекарственные препараты (ЛП) лазикс (фуросемид) фирмы «Aventis», тринитроглицерин фирмы «Шварц Фармааг», преднизолон фирмы «Никомед», строфантин фирмы «Галичфарм», вурдон и дигоксин фирмы «Глаксо Смит Клине» в настоящее время используются при терапии сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт миокарда, сердечная аритмия, гипертония, атеросклероз, сердечная недостаточность) [1-3]. Однако под воздействием этих ЛП наблюдаются некоторое отклонение от нормы эндогенных уровней металлопротеинов (МП) крови - регуляторов метаболизма активных форм кислорода, а также изменение антиоксидантного и прооксидантного статусов сыворотки крови и эритроцитов больных с возникновением соответственного фона оксидативного стресса. Для выявления механизмов воздействия ЛП *in vivo* необходимо определить характер их действия на оптико-спектральные показатели и биологическую активность МП крови *in vitro*.

Целью работы являлось определение изменений оптико-спектральных характеристик, активности антиоксидантного действия МП (Cu, Zn - СОД, каталаза, церулоплазмин и трансферрин) и прооксидантного действия МП крови (цитохром b 558 III (цит. b 558 III) мембран эритроцитов и супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки - супрол) под воздействием соответствующих доз ЛП *in vitro*.

Материал и методика. Металлопротеины (МП) антиоксидантного действия (СОД и каталаза - из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин - ЦП и трансферрин - ТФ из сыворотки крови) и МП прооксидантного действия (супрол и цит. b 558) получали биотехнологическим способом, без использования детергента [5-9]. При этом белковые фракции сыворотки, растворимой фракции эритроцитов и мембран эритроцитов подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 («Whatman», Англия), сефадексе ДЕАЕ А-50 («Pharmacia», Швеция) и гель - фильтрации на биогеле Р-100 («Reanal», Венгрия) и сефадексе G-100 («Pharmacia»). Эти МП (кроме супрола) очищены до электрофоретически гомогенных состояний и растворены в 0,01 М калий - фосфатном буфере, pH 7,4 (КФБ). Лазикс (10 мг/мл), тринитроглицерин (10мг/мл), преднизолон (10 мг/мл), строфантин (0,25 мг/мл), вурдон (10 мг/мл) и дигоксин (0,25 мг/мл) по 0,5 мл смешивали с 0,5 мг/мл раствора МП (по 3 мл) и инкубировали в течение 4-х дней при 4°. К контрольным пробам МП были добавлены 0,5 мл воды или физиологического раствора.

Количество МП определяли измерением плотности характерного максимального оптического поглощения для цит. b 558 III при 530 нм, супрола - 430 нм, ТФ - 470 нм и ЦП - 610 нм. Супероксиддисмутазную (СОД) активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола и цит. b 558 III определяли с использованием нитротетразолиевого синего (НТС), путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или методом стимулирования (в случае супрола или цит. b 558 III) образования формазана (при 560 нм). За единицу СОД активности принимали то количество фракции, которое вызывает 50%-ное ингибирование образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу супероксидпродуцирующей активности супрола или цит. b 558 III принимали то количество белка, которое способно стимулировать на 50% образование формазана. Каталазную активность определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода, рассчитывая то количество белка, которое расщепляет 0,1 М перекиси водорода за 1 мин при 20°. Удельная активность СОД или каталазы была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. Удельная супероксид - продуцирующая активность супрола или цит. b 558 III была определена в расчете на 1 мл сыворотки или 1 мл эритроцитов соответственно. СОД–миметическая активность ЛП была определена в расчете на 1 мг этих препаратов. Метгемоглобин (мет.Нв, с A_{560}=0,6) восстанавливающая активность цит. b 558 III (A_{530}=0,02) была определена кинетическим методом, путем измерения прироста величины плотности максимального оптического поглощения образовавшегося феррогемоглобина (ферроНв) при 555 нм в течение 4-х дней при 20° [13, 11], в отсутствие и при наличии определенного количества (1 мг) ЛП. Степень рилизинг эффекта цит. b 558 III из эритроцитарных мембран (степень отщепления цит. b 558 из этих мембран при pH 7,4 при инкубировании последних в отсутствие и при наличии ЛП (1 мг/мл) в течение 4-х дней при 4° в аэробных условиях) определяли оптическим спектральным методом, путем измерения плотности максимального оптического поглощения отщепленного цит. b 558 в гомогенной фазе при 530 нм. При этом использовали очищенные от следов Hb эритроцитарные мембраны (по 2 мл, смешанные с 0,04 М КфБ) из свеженабранной донорской крови. Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию белковых фракций осуществляли, поместив смолы в стеклянные колонки различных размеров (3х20, 2х20, 2х80, 1х15 см). В ходе получения и очистки МП были также использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия «Р».

Результаты и обсуждение. После 4-дневного инкубирования ЛП,

используемых при терапии сердечно-сосудистых заболеваний (лазикс, тринитроглицерин, преднизолон, строфантин, вурдон и дигоксин) с МП донорской крови антиоксидантного действия (СОД, каталаза, ЦП и ТФ) и с МП прооксидантного действия (цит. b 558 III и супрол) в подавляющем большинстве случаев наблюдается снижение активности СОД, каталазы и плотности максимального поглощения ЦП (при 610 нм) и цит. b 558 III (при 530 нм), а также метHb - восстанавливающей активности цит. b 558 III (табл.).

Таблица. **Относительные изменения (%) уровней и активности МП под воздействием ЛП, по сравнению с 100%-ными контрольными показателями (P< 0,05, n=12)**

МП и активность	Лазикс	Тринитро-глицерин	Преднизолон	Строфантин	Вурдон	Дигоксин
$O^{\cdot}_2$-продуцир. активн. супрола	-62,5±6,1 P<0,01	+2,1±0,2	-12,3±1,4	-7,5±0,3	-87,5±8,4 P<0,03	не влияет
$O^{\cdot}_2$-продуцир. активн. цит. b 558 III	-15,4±2,1	-20,0±2,3	не влияет	-25,0±3,3 P<0,001	-101,0±8,3	-30,1±3,1 P<0,03
Мет. Hb-восстанавл. активн. цит. b 558 III	не влияет	-12,4±1,6	-16,1±2,0	не влияет	-31,5±2.9	не влияет
ЦП	-21,3±2,4	не влияет	-61,1±3,4 P<0,01	не влияет	-30,3±3,1 P<0,001	не влияет
Cu, Zn - СОД активность	-12,4±1,1	+5,4±0,2	-21,1±2,3	не влияет	-26,7±2,4	-8,7±1,0
Каталаза активность	-29,3±2,1	-33,2±2,4 P<0,03	не влияет	-64,7±3,1	-71,7±4,3 P<0,03	не влияет

Эти ЛП по-разному взаимодействуют с МП. Заметно снижается супероксидпродуцирующая активность супрола под воздействием лазикса и вурдона, остальные ЛП практически не инактивируют супрол. Понижение супероксидпродуцирующей активности супрола так или иначе снижает уровень липидной пероксидации этого НАДРН-содержащего липопротеина высокой плотности, продуцирующего супероксиды в присутствии следов ионов переходных металлов (Fe^{3+}, Cu^{2+}), предотвращая этим самоагрегацию супрола [8]. Это в свою очередь предотвращает повышение вязкости сыворотки, что является положительным эффектом для организма. Супероксид-продуцирующая активность цит. b 558 III ощутимо снижается под воздействием ЛП. Это может быть положительным эффектом с точки зрения того, что продуцируемые супероксиды могут вызывать дестабилизацию (липидную пероксидацию) эритроцитарных мембран [12, 14]. Однако снижение супероксидпродуцирующей активности может и отрицательно влиять на метаболические процессы в мембранах эритроцитов, происходящие с участием супероксидных радикалов. Какие из этих явлений более доминирующие, покажут дальнейшие исследования. Выявленная недавно метHb-восстанавливающая активность цит. b 558 III [13, 11] практически мало изменяется под воздействием ЛП (табл.), за исключением вурдона,

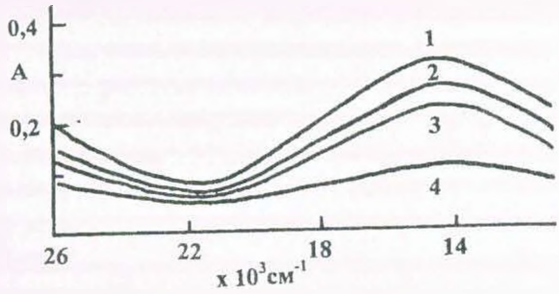

Рис.1. Оптические спектры ЦП после 4-дневного инкубирования при 4° с ЛП: в отсутствие ЛП (1) и в присутствии лазикса (2), вурдона (3) и преднизолона (4).

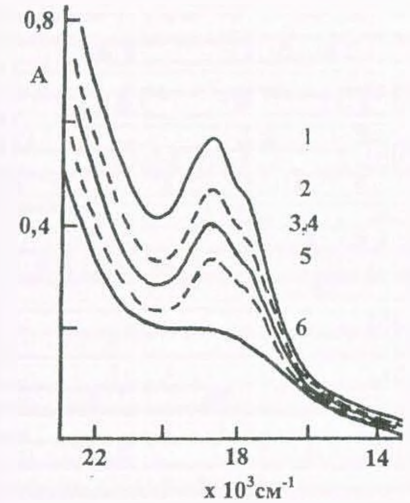

Рис. 2. Оптический спектр цит. b 558 III, после его 4-дневного инкубирования при 4° с ЛП: в отсутствие ЛП (1) и в присутствии строфантина (2), дигоксина (3), лазикса (4), нитроглицерина (5) и преднизолона (6).

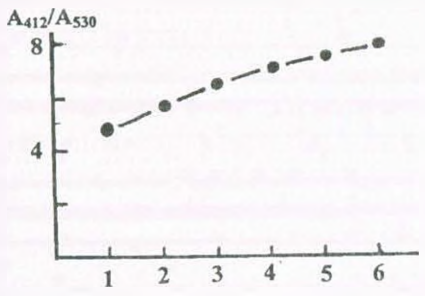

Рис. 3. Изменение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{530}) цит. b 558 III: в отсутствие ЛП (1) и в присутствии 1 мг строфантина (2), лазикса (3), дигоксина (4), нитроглицерина (5) и преднизолона (6).

который снижает эту активность. Изменение метHb-восстанавливающей активности цит. b 558 III так или иначе может влиять на кислородный гомеостаз крови. МетHb не способен перенести молекулярный кислород, уровень его повышается при злокачественных новообразованиях. Лазикс, преднизолон и вурдон необратимо снижают интенсивность поглощения ЦП (при 610 нм) - белка острой фазы, деградируя его (рис.1) [4]. Это может вызывать увеличение уровня супероксидов и ионов меди в крови, создавая определенный фон оксидативного повреждения различных компонентов крови.

Высокотолерантное действие против приведенных ЛП оказывает ТФ (не изменяются его оптико-спектральные показатели). ЛП снижают активность ключевых МП антиоксидантного действия, особенно каталазы, что крайне нежелательное явление и может быть причиной накопления перекиси водорода, а также вызывать оксидативный стресс (табл.).

Механизм воздействия упомянутых ЛП во многом связан с их СОД - миметической активностью, что для лазикса составляет 22,7±2,1 ед/мг, строфантина - 110±8,5 ед/мг и вурдона - 120±9,0 ед/мг. Тринитроглицерин, преднизолон и дигоксин не обладают СОД-миметической, а также каталазной активностью. ЛП неодинаково влияют на оптико-спектральные показатели цит. b 558 III (рис. 2). Возможно, они влияют на хромофорную группу цит. b 558 III, снижая интенсивность поглощения

при 530 нм. Этот эффект более выражен под воздействием преднизолона, вызывая деградацию цит. b 558 III, основного гемопротеина мембран эритроцитов, и снижение текучести этих мембран. Однако такой вывод носит предварительный характер, так как было выявлено непосредственное действие преднизолона на цит. b 558 III в гомогенной фазе, а не в эритроцитарных мембранах (в гетерогенной фазе). ЛП по-разному изменяют и величину оптического индекса цит. b 558 III в гомогенной фазе (рис. 3). Они несколько изменяют и окислительно-восстановительные характеристики цит. b 558 III под воздействием дитионита натрия (рис. 4).

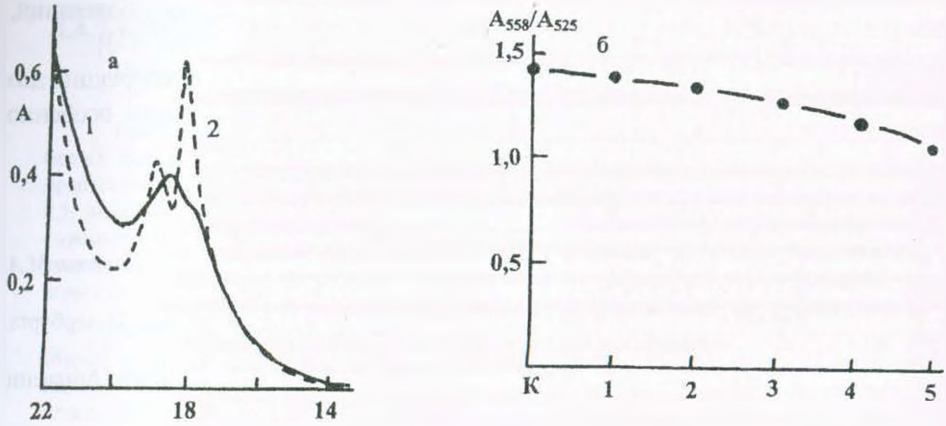

Рис. 4. Оптический спектр цит. b 558 III в окисленном (1) и восстановленном (2) дитионитом натрия (0,5 мг) состояниях: а — для нативного цит. b 558 III, б — отношение плотности поглощения при 558 нм к плотности поглощения при 525 нм на оптическом спектре поглощения цит. b 558 III после восстановления дитионитом натрия в отсутствие (1) и присутствии по 1 мг дигоксина (2), строфантина (2), лазикса (3), нитроглицерина (4) и преднизолона (5).

Этот эффект более выражен при действии преднизолона, снижая отношение A_{558}/A_{525} как фактора некоторого подавления процесса восстановления ионов железа в простетический группе цит. b 558 III. Для определения характера действия ЛП на эритроцитарные мембраны при процессе рилизинга (отщепления) цит b 558 из этих мембран были инкубированы ЛП с эритроцитарными мембранами при 4° в течение 4-х дней. Как показано на рис.5, процесс рилизинга цит. b 558 подавляется больше теми ЛП, у которых СОД-миметическая активность выше, например, вурдон подавляет рилизинг на 50%. Действительно, МП антиоксидантного действия (СОД и ЦП) и другие соединения такого же действия (ДМСО и богатый пролином полипептид из секреторных гранул мозга ПБП) заметно

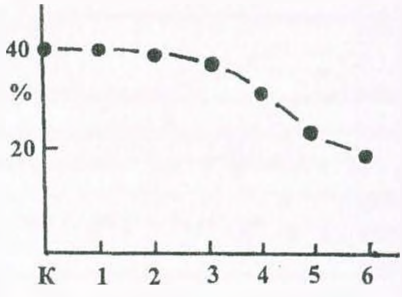

Рис. 5. Процент подавления рилизинга цит. b 558 из эритроцитарных мембран: в отсутствие ЛП (К) и в присутствии 1 мг тринитроглицерина (1), преднизолона (2), дигоксина (3), лазикса (4), строфантина (5) и вурдона (6). Время инкубирования смеси эритроцитарных мембран с ЛП 4 дня при 4°.

подавляют рилизинг цит. b 558 из эритроцитарных мембран [10]. Можно констатировать, что последный обратно пропорционален СОД - миметической активности ЛП. Вероятно, он связан с липидной пероксидацией эритроцитарных мембран, которая подавляется антиокисдантными действиями препаратов [10]. Подавление рилизинга цит. b 558, несомненно, положительное мембраностабилизирующее явление. Таким образом, ЛП различного характера по-разному влияют (положительно или отрицательно) на уровень и активность МП анти- и прооксидантного действия - регуляторов метаболизма активных форм кислорода в крови. Возможно, такое различие характера действия ЛП на МП и эритроцитарные мембраны *in vitro* и *in vivo* отражается и на эффективности терапии сердечно-сосудистых заболеваний, что часто не приводит к достаточно желательным результатам [1-3].

Полученные результаты могут быть использованы для коррекции доз используемых ЛП при терапии сердечно-сосудистых заболеваний, особенно учитывая по-новому оцененные побочные эффекты ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексанян Сергей С., Симонян Г.М., Степанян А.А., Алексанян С.С., Симонян М.А.* Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга., 9, 136-139, 2004.
2. *Алексанян С.С., Степанян А.А., Симонян М.А.* Вестник МАНЕБ Санкт-Петербурга, 8. 164-167, 2003.
3. *Алексанян С.С., Симонян Р.М., Степанян А.А., Симонян М.А.* Мед. наука Армении, 2, 62-65, 2003.
4. *Мжельская Т.И.* Бюлл. Эксп. Биол. Мед., 130, 124-132, 2000.
5. *Симонян М.А., Симонян Г.М.* Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобретения N341 Армпатента, Ереван, 1997.
6. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М.* Способ получения цитохромов в из мембран эритроцитов. Лицензия изобретения N908 Армпатента, Ереван, 2001.
7. *Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М.* Биохимия, 60, 1977-1987, 1995.
8. *Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Биолог. журн. Армении, *52*, 1, 18-21, 1999.
9. *Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А.. Симонян Р.М.* Биохимия, 61, 932-938, 1996.
10. *Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А.* Мед. наука Армении, 3, 13-18, 2003.
11. *Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А.* Мед. наука Армении, 1, 43-46, 2004.
12. *Muura T., Ogiso T.* Chemical and Pharmaceutial Bulleten (Japan), 30, 3662-3670, 1982.
13. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Babayan M.A., Simonyan M.A., Galoyan A.A.* Intern. Conf. The roll of the Biologically Active Substances in the integrative Activity of the Organizm in Normal Conditions and in the Process of Adaptive Syndrome Formation. Yerevan State Med. University, 148-149, 2003.
14. *Tien M., Svingen B.A., Aust S.D.* Fed. Proc., 40, 179-182, 81.

Поступила 15.IV.2004