

Биолог. журн. Армении, 1-2 (59), 2007

УДК 577.12.612:611.36

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 2-ЦИАН-3,4,4-ТРИМЕТИЛ-2- БУТЕН-4-ОЛИДА НА УРОВЕНЬ И АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ ТКАНЕЙ *IN VITRO* И *EX VIVO*

Г.М. ГАЛОЯН*, П.А. КАЗАРЯН**, А.А. АВЕТИСЯН*, М.А. СИМОНЯН***

*Ереванский государственный университет, 0025

**Гематологический центр им. проф. Р.Еояна МЗ РА, 375014, Ереван

***Институт биохимии им. Г.Бунятыяна НАН РА, 375014, Ереван

ЦТБО (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид) в большинстве случаев не является токсическим для металлопротеинов антиоксидантной и прооксидантной активности крови и печени. За исключением сывороточного церулоплазмينا ЦТБО оказывает положительное воздействие путем повышения каталазной и метHb-восстанавливающей активности цит b558 мембран эритроцитов и гепатоцитов, в гомогенной и гетерогенной фазах (непосредственно в мембранах) и снижением степени самоагрегации сывороточного липопротеина высокой плотности - супрала *in vitro* и *ex vivo*.

2-Ցիան-3,4,4-երրորդային-2-բութեն-4-օլիդ (ՑԵԲՕ) հիմնականում չի ցուցաբերում տոքսիկ ազդեցություն հակա- և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների վրա, բացառությամբ ցերուլոպլազմինի: ՑԵԲՕ ցուցաբերում է դրական ազդեցություն՝ բարձրացնելով կատալազայի և ցիտոքրոմ b558-ի մետհեմոգլոբինի վերականգնելու ակտիվությունը էրիթրոցիտների և լյարդի բջիջների թաղանթներում հոմոգեն և հետերոգեն ֆազերում (անմիջապես թաղանթներում) և նվազեցնելով շիճուկային բարձր խտություն ունեցող լիպոպրոտեինի-սուպրալի ինքնագրեգացման աստիճանը *in vitro* և *ex vivo*:

On the whole the 2-cyan-3,4,4-trimethyl-2-buten-4-olid (CTBO) compound has no toxic effect on the anti- and prooxidative activity metalloproteins except ceruloplasmin. CTBO indicates positive effect increasing the catalase activity in the erythrocytes, especially in the liver, elevating the metHb-reducing activity of cytochrome b558 from erythrocyte membranes and liver cell membranes in homogenous and heterogenous phases (immediately in membranes) as well as decreasing the self-aggregation degree of serum high density lipoprotein — suprol *in vitro* and *ex vivo*.

2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид - металлопротеины - кровь - печень

Ненасыщенные гамма-лактоны (бутенолиды), включая 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олил (ЦТБО), являются компонентами как природных (витамин С, пенициллаовая кислота, альфа- и бета-ангеликалактоны, протоанемонин, кловацин, карденолиды и т.д.), так и синтетических лекарственных препаратов (строфант, ацетоминин, пилюкарпин, антибиотик и т.д.), применяемых при терапии различных заболеваний (сердечно-сосудистых, диабета, злокачественных новообразований и др.) [1]. Для определения степени безвредности (токсичности) и эффективности применения ЦТБО целесообразно определить его влияние на состояние

ключевых систем-регуляторов метаболизма активных форм кислорода крови и других тканей [4, 5].

Целью работы является одновременное определение характерных изменений уровня и активности известных металлопротеинов антиоксидантной активности — МАА (Cu, Zn-СОД, каталаза, перулоплазмин и трансферрин из крови и Mn-СОД из печени) и металлопротеинов прооксидантной активности — МПА (новые изоформы цитохрома b558 сыворотки крови, эритроцитарных мембран (ЭМ) и мембран клеток печени (МКП), супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки — супрол, а также цитохром b5 из цитозоля эритроцитов и цитохром C из клеток печени) под непосредственным воздействием ЦТБО *in vitro* и *ex vivo*.

Материал и методика. Препарат ЦТБО синтезирован академиком А.А.Аветисян и соотр. и любезно предоставлен для использования в этой работе. МАА и МПА получали биотехнологическим способом [6] без использования детергента, который снижает стабильность этих белков [7]. Количество металлопротеинов (МП) определяли путем измерения плотности характерного максимального оптического поглощения для цитохрома (цит) b5 при 525 нм, изоформ цит b558 — 530, супрола — 430, перулоплазмينا (ПП) — 610 нм и трансферрина (ТФ) — 470 нм. СОД-активность белков определяли нитротетразолиевым синим (НТС) [11], а каталазную активность — перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода в отсутствие и присутствии определенного количества белка. Супероксид-улавливающую активность ЦТБО определяли перекисным методом, путем измерения снижения плотности оптического поглощения красителя кумеси бриллианта синего (КБС) супероксидными радикалами ($O_2^{\cdot -}$), генерированными при расщеплении перекиси водорода при pH выше 7 [12]. НАДРН-зависимую $O_2^{\cdot -}$ продуцирующую активность цитb558 из ЭМ и МКП крыс в гомогенизированной и гетерогенной фазах (в МК) также определяли НТС методом, путем вычисления процента повышения плотности поглощения формазана, который образуется в результате восстановления НТС супероксидными радикалами в присутствии 1 ммоль НАДРН [8]. За единицу этой активности принимали количество цит b558, вызывающее 50%-ное увеличение плотности оптического поглощения формазана (при 560 нм).

Метгемоглобин (метHb) - восстанавливающую активность цит b558 в гомогенизированной и гетерогенной фазах (в ЭМ и МК) определяли спектральным методом [13], путем измерения снижения плотности оптического поглощения альфа-полосы ферриHb (Fe^{3+} - Hb). Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb. При этом A_{415} для цит b558 в реакционной смеси (3 мл) составляло 0,04.

В первой серии экспериментов МАА и МПА определенного количества и активности инкубировали с ЦТБО (10 мг/мл) в аэробных условиях при 4° в течение 48 ч. Далее определяли уровень и активность МП в отсутствие (контроль) и присутствии ЦТБО *in vitro*.

Во второй серии экспериментов кровь (по 20 мл) и гомогенат печени (20 г печени гомогенизировали в 50 мл 0,04 М калий фосфатном буфере pH 7,4 — КФБ) инкубировали с 10 мг/мл ЦТБО (последний был растворен в физиологическом растворе) в течение 4 сут также при 4° в аэробных условиях *ex vivo*. Далее получали МП из крови и гомогената печени с определенным количеством очищенных ЭМ (по 5 мл) и МКП (по 5 мл) для определения активности цит b558 в гетерогенной фазе (в этих мембранных локализованы цит b558). МКП и ЭМ очищали многократным промыванием 0,04 М КФБ.

Для определения НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей активности цитb558 в гетерогенной фазе (в мембранах) к 3 мл реакционной смеси добавляли до 0,2 мл смеси этих мембран с 0,04 М КФБ. В контрольных опытах синхронно получали МП и мембраны в отсутствие ЦТБО.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общезвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности P.

Результаты и обсуждение. ЦТБО не обладает каталазной активностью, но способен снизить скорость обесцвечивания КБС ($53,3 \pm 6,2$ %)

продуцированными при расщеплении перекиси водорода супероксидными радикалами. Отмеченный факт свидетельствует о том, что в этой системе ЦТБО обладает супероксидулапнявающей активностью. Эта система продуцирования супероксидов является более естественной системой, в которую вовлечены как перекись водорода, так и гидроксильные радикалы и супероксиды, которые вызывают определенные изменения свойств МАА и МПА.

В результате инкубирования ЦТБО с очищенными МАА и МПА *in vitro* уровень МПА (цит b5, цит b558 сыворотки крови, цит b558 ЭМ и МК печени, а также цит С) практически не изменяется (табл.). Полученные данные свидетельствуют о том, что ЦТБО не является деградирующим МПА агентом *in vitro*. ЦТБО несколько уменьшает и самоагрегацию супрола, видимо, путем снижения уровня продуцируемых супролом O_2^- , которые вызывают перекисное окисление фосфолипидных остатков супрола; супрол является важным фактором сохранения вязкости сыворотки и в целом крови. По нашим данным, ЦТБО практически не влияет на свойства ТФ и каталазы, но вызывает небольшое увеличение активности Cu,Zn-СОД и Mn-СОД из цитозоля гепатоцитов. С другой стороны, ЦТБО снижает НАДРН-зависимую супероксидпродуцирующую активность изоформ цит b558 из ЭМ и МКП, при этом не вызывая ощутимых изменений оптического-спектральных показателей этих гемопротеинов.

Таблица. Относительное изменение уровня и активности МАА и МПА под воздействием ЦТБО *in vitro* и *ex vivo*, по сравнению со 100 %-ными контрольными показателями ($P < 0,05$, $n = 8$). %

МП, активность	<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>
Цит b5	-4,3±0,4	-66,7±5,8
Сумма цит b558 сыворотки крови	+1,9±0,3	+1,7±0,8
Сумма цит b558 ЭМ	+2,3±0,2	+13,1±0,7
Сумма цит b558 МКП	+2,7±0,4	+33,7±4,4
Цит С из печени	+1,8±0,3	+10,4±2,5
Супрол	+12,1±1,9	+19,4±5,1
ЦП	-24,3±2,4	-26,5±4,1
ТФ	-1,7±0,4	-2,5±0,6
Активность Cu,Zn-СОД из гемолизата	+8,1±0,3	+11,8±0,5
Активность Cu,Zn-СОД и Mn-СОД из печени	+8,5±0,4	+15,2±2,9
Активность каталазы из гемолизата	+2,4±0,3	+104,2±9,5
Активность каталазы из печени	+3,7±0,6	+29,8±0,6
O_2^- -продуцир.активн. супрола	+11,4±3,2	+9,3±1,8
O_2^- -продуцир.активн. цит b558 ЭМ в гомоген. фазе	-12,1±0,8	-
O_2^- -продуцир.активн. цит b558 ЭМ в гетероген. фазе	-	-52,4±5,1
O_2^- -продуцир.активн. цит b558 МКП в гомоген. фазе	-8,4±0,2	-
O_2^- -продуцир.активн. цит b558 МКП в гетероген. фазе	-	-45,1±4,3
МетНb-восстанавл.активн. цит b558 ЭМ в гомоген. фазе	+18,3±0,2	-
МетНb-восстанавл.активн. цит b558 ЭМ в гетероген. фазе	-	+41,1±2,6
МетНb-восстанавл.активн. цит b558 МКП в гомоген. фазе	+21,8±0,3	-
МетНb-восстанавл.активн. цит b558 МКП в гетероген. фазе	-	+53,4±4,9

В опытах *ex vivo* в результате инкубирования крови и гомогената печени с ЦТБО направленность вышеприведенных изменений сохраняется, однако амплитуда последних существенно увеличивается (табл.). Наблюдается резкое снижение уровня цит b5 (этот гемопротеин участвует в процессе ферментативного восстановления метHb метгемоглобинредуктазой в цитозоле эритроцитов [9]). Возможно, эта потеря компенсируется повышением метHb-восстанавливающей активности цит b558 ЭМ и МКП. В свою очередь, хотя уровень образовавшегося цит b558 сыворотки крови не изменяется, однако уровень цит b558 ЭМ и МКП повышается. Этот факт свидетельствует о том, что ЦТБО имеет доступ к ЭМ и МКП и положительно влияет на процесс сольubilизации цит b558 из этих клеток. Это не может считаться положительным эффектом ЦТБО, так как, возможно, он влияет на метаболизм фосфолипидов этих мембран, ответственных за удерживание цит b558 в гидрофобной фазе и может вызвать изменение микроструктуры ЭМ и МКП, для которых цит b558 являются структурными компонентами и стабилизирующими факторами. Снижение уровня ЦП имеет место и в опытах *ex vivo*, что является побочным нежелательным фактором воздействия ЦТБО, и это необходимо учитывать при его использовании ЦТБО. Некоторое повышение активности СОД в ЭМ и гепатоцитах можно связать с понижением уровня супероксидов, продуктом ферментативного дисмутирования которых является перекись водорода. Последняя может превращаться в высокоактивные НО₂ радикалы под воздействием ионов переходных металлов [3]. Эти гидроксильные радикалы являются деградирующими агентами для МАА и МПА [9,10,11,14]. Супероксидпродуцирующая активность супрола практически не изменяется и в экспериментах *ex vivo*. Однако эта активность для цит b558 в ЭМ и МКП заметно снижена. С одной стороны, это может считаться положительным эффектом ЦТБО, так как снижается вероятность окислительного повреждения окружающих биосистем этими радикалами, с другой — снижение уровня супероксидов может вызывать соответственное снижение интенсивности жизненно важных метаболических процессов, происходящих в эритроцитах и гепатоцитах. Это необходимо учитывать для определения эффективной и безвредной дозы ЦТБО.

Феноменальным может считаться повышение каталазной активности в гепатоцитах, особенно в эритроцитах (104 %). Механизм такого повышения каталазной активности пока трудно определить, хотя возможно, что ЦТБО в этих условиях вызывает экспрессию гема каталазы. Это, несомненно, можно считать важным положительным эффектом ЦТБО. Другим положительным воздействием его является повышение метHb-восстанавливающей активности цит b558 ЭМ и МКП, так как оно может снизить уровень метHb, неспособного перенести к клеткам молекулярный кислород, нормализовать кислородный гомеостаз и снизить уровень анемии, что часто наблюдается при злокачественных новообразованиях [2].

На основании вышеизложенного можно заключить, что ЦТБО в большинстве случаев не является деградирующим для МАА и МПА агентом.

за исключением ЦП, повышает каталазную активность в эритроцитах и гепатоцитах и увеличивает в них метHb-восстанавливающую активность цит b558, как в гомогенной, так и гетерогенной фазах, снижает степень агрегации сывороточного липопротеина высокой плотности — супрола *in vitro* и *ex vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г. Хим. ж.Армении, 46, 3-4, 219-226, 1993.
2. Казарян П.А., Аветисян А.А., Саакян Л.С., Галоян Г.М., Асоян А.У., Саркисян К.Э. Мат-лы междунар. конф. «Успехи биотехнологии: перспективы развития в Армении». Ереван, Цахкадзор, с.200, 2006.
3. Мэжелская Т.И. Бюлл. эксп. биол. мед., 130 (8), 124-132, 2000.
4. Симосян М.А., Бабаян М.А., Симосян Г.М. Биохимия, 60 (12), 1977-1987, 1995.
5. Симосян М.А., Каранетян А.В., Бабаян М.А., Симосян Р.М. Биохимия, 61 (5), 932-938, 1996.
6. Симосян М.А., Симосян Г.М. Лицензия изобрет. No 341 Армпатента. Ереван, 1997.
7. Симосян Г.М., Симосян М.А., Симосян Р.М. Лицензия изобретения N 908 Армпатента. Ереван, 2001.
8. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Каранетян А.В., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLIII, 1, 30-34, 2003.
9. Abe K., Sugita Y. Eur. J. Biochem., 101 (9), 423-428, 1979.
10. Aldazhov E. Exp. Med. Morphol., 26, 39-41, 1987.
11. Fridovich I. Ann. Rev. Biochem., 64, 97-112, 1995.
12. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Biochim.Biophys.Acta, 583 (3), 279-286, 1979.
13. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A. Electronic J. Natural Sciences NAS RA, 2 (7), 3-6, 2006.
14. Stroke P.E., Farber J.L. J. Biol. Chem., 260 (18), 10099-10104, 1985.

Поступила 15.1.2007