



• *Փորձարարական և
տեսական հոդվածներ* •

• *Экспериментальные и
теоретические статьи* •

• *Experimental and
theoretical articles* •



Биолог. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

А.А.АНТОНЯН¹, С.Г.ШАРОЯН¹, А.А.АРОЯН², Р.А.АРУТЮНЯН²,
С.С.МАРДАНЯН¹

¹ Институт биохимии им. Г.Х. Буятяна НАН РА

² Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци
biochem@ipia.sci.am

При воспалительных заболеваниях суставов активность аденозиндезаминазы (АДА) в синовиальной жидкости (СЖ) больных достоверно выше, чем при невоспалительных поражениях суставов. Фермент понижает концентрацию аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами, способствуя усилению процесса. С целью выявления средств, ингибирующих активность фермента в СЖ, проведено *ex vivo* исследование влияния на активность АДА классического ингибитора EHNA, а также производных EHNA и аденозина. Кроме того, исследовано влияние на активность АДА этаноловых экстрактов 4-х видов растений и выделенных из них 6-ти фракций. Вычислены концентрации полумаксимального ингибирования исследованных препаратов IC₅₀. Эффективность ингибирования АДА в СЖ исследованными синтезированными соединениями сравнима с ингибированием препаратов АДА, очищенных из различных биологических жидкостей человека. Достаточно низкий порядок величин IC 50 для ингибирования фермента в СЖ позволяет рассматривать исследованные растительные препараты перспективными противовоспалительными средствами. На основании результатов описанных *ex vivo* исследований можно предложить проведение клинических исследований синтетических и природных ингибиторов АДА в качестве лечебных средств при воспалительных артритах.

*Аденозиндезаминаза - воспалительный артрит - ингибирование фермента -
растительные препараты - синовиальная жидкость.*

Յոդերի բորբոքային ախտահարումների ժամանակ հիվանդների սինովիալ հեղուկում (ՍՀ) ադենոզինդեզամինազի (ԱԴԱ) ակտիվությունը հավաստիորեն ավելի բարձր է հոդերի ոչ-բորբոքային ախտահարումների նկատմամբ: Ֆերմենտը նվազեցնում է հակաբորբոքային ազդեցությամբ օժտված ադենոզինի կոնցենտրացիան և նպաստում բորբոքման խորացմանը: ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվությունը ընկճող միջոցներ ի հայտ բերելու նպատակով, *ex vivo* ուսումնասիրվել է ակտիվության վրա ֆերմենտի հայտնի արգելակիչ էՀՆԱ-ի, դրա և ադենոզինի ածանցյալների ազդեցությունը: Ուսումնասիրվել է նաև 4 բույսի էթանոլային թուրմերի և դրանցից անջատված 6 ֆրակցիաների ազդեցությունը ԱԴԱ-ի ակտիվության վրա: Հաշվարկվել են ուսումնասիրված նյութերով կիսամաքսիմալ ընկճման կոնցենտրացիաները, IC₅₀: Սինթեզված միացություններով ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվության ընկճման էֆեկտիվությունը համեմատելի է մարդու տարբեր կենսաբանական հեղուկներից անջատված ֆերմենտի ընկճման հետ: Հետազոտված բուսական պատրաստուկներով ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվության ընկճման IC₅₀-ի բավական ցածր արժեքները թույլ են տալիս դիտարկել դրանք որպես հեռանկարային հակաբորբոքային միջոցներ:

Ակարագրված *ex vivo* հետազոտության արդյունքների հիման վրա կարելի է առաջարկել ԱԴԱ-ի սինթետիկ և բնական արգելաիչների կլինիկական փորձարկումը, որպես հակաբորբոքային միջոցներ:

Ադենոզինդեամինազ - բորբոքային արթրիտ - սինովիալ հեղուկ - ֆերմենտի ակտիվության ընկճում - բուսական պատրաստուկներ - սինթետիկ արգելաիչներ

Activity of adenosine deaminase (ADA) in sinovial fluid (SF) of patients at inflammatory joint diseases is significantly higher than at non inflammatory diseases. The enzyme reduces the concentration of anti-inflammatory agent, adenosine, and contributes to the inflammation development. To reveal the natural inhibitors of ADA in SF, the action of its known inhibitor, EHNA, and two derivatives of adenosine and EHNA were studied *ex vivo*. The influence of ethanol extracts of 4 plants, used as food and in folk medicine, and of 6 their fractions were studied also. The half-maximal inhibition concentrations, IC_{50} , for all studied preparations were calculated. The efficiency of ADA inhibition in SF by synthesized compounds is comparable with inhibition of ADA purified from human different biological fluids. Rather low order of IC_{50} values for ADA inhibition in SF by studied plant preparations allow us to consider them as prospective anti-inflammatory remedy. Based on the obtained results we can offer the clinical testing of synthetic and natural inhibitors of ADA as anti-inflammatory agents.

Adenosine deaminase - inflammatory arthritis- sinovial liquid- inhibition coefficient; plant preparations- synthesized inhibitors

Воспалительные заболевания суставов представляют собой гетерогенную группу нарушений, затрагивающих не только суставные ткани, но часто многие органы в организме. Они приводят к ранней потере трудоспособности, характеризуются высокой летальностью [5, 6]. 1-2 % населения мира страдает от этого заболевания. Его причины и факторы, приводящие к воспалительным процессам, пока не выяснены. Для лечения предлагаются нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикостероиды, и ряд противоревматических препаратов.

При метаболических стрессах и клеточных нарушениях в ишемических, гипоксических и воспаленных тканях во внеклеточной среде накапливается аденозин, играющий роль защитного агента [2, 7]. Аденозин участвует в снижении уровня провоспалительных и повышении уровня противовоспалительных цитокинов, регулировании воспалительной функции макрофагов, моноцитов и эндотелиальных клеток. Предполагается, что аденозин вовлечен в регуляцию воспалительных суставных заболеваний [3, 11].

Аденозиндезаминаза (АДА, К.Ф. 3.5.4.4) [4] ответственна за катаболизм аденозина. Она представлена практически во всех тканях человека [9]. Оказалось, что при воспалительных артритах активность АДА в синовиальной жидкости (СЖ) больных значительно выше, чем при невоспалительных поражениях суставов [8, 12]. Это способствует усилению развития воспаления, поскольку фермент снижает уровень противовоспалительного агента аденозина. Поэтому ингибирование АДА может явиться терапевтическим подходом для смягчения воспалительного процесса.

Данная работа направлена на выявление средств ингибирования АДА в СЖ. Было исследовано влияние производных субстрата фермента, аденозина, а также его классического ингибитора EHNA и его производных. Исследовано также влияние на активность АДА этаноловых экстрактов 4-х видов растений и выделенных из них 6-ти фракций.

Материал и методика.

Аденозин и EHNA приобретены в фирме Сигма, США. Их производные были синтезированы в Университете Камерино, Италия.

Синовиальные жидкости брали в Ереванском медицинском центре “Эребуни”. Образцы хранили при -20°C. Перед исследованием их размораживали и центрифугировали.

Экстракты растений и их фракции получали как описано нами ранее [1].

Активность АДА оценивали по количеству аммиака, выделенного в реакции дезаминирования аденозина, используя фенолгипохлоритный колориметрический метод, описанный нами ранее [10]. Активность выражали в международных единицах IU.

При исследовании влияния на активность фермента синтезированных препаратов в инкубационную смесь добавляли аликвоту исходного водного раствора препарата до определенной концентрации. При исследовании влияния растительных препаратов, исходные растворы высушенных препаратов готовили в 70 %-ном этаноле. При этом концентрация этанола в инкубационной смеси не превышала 2 %, и не влияла на активность АДА. Для определения концентрации полумаксимального ингибирования АДА (IC₅₀) исследуемыми препаратами, определяли активность фермента при разных концентрациях препарата, и из концентрационных зависимостей вычисляли IC₅₀, используя компьютерную программу GraFit Version 5 (Leatherbarrow, 2001, Erithacus Software Ltd., Horley, UK)

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

Результаты и обсуждение.

В качестве ингибитора АДА в синовиальной жидкости было целесообразно в первую очередь исследовать производные субстрата фермента, 1-деза аденозин (1d-Ado) и 3-деза аденозин (3d-Ado).

На рис.1 представлена зависимость активности АДА и его ингибирования от концентрации 1d-Ado. Из литературы известно, что это соединение ингибирует выделенный и очищенный из животных тканей АДА по конкурентному механизму [10]. В наших опытах эффективность его ингибирования достигала максимума при концентрации 4 мкг/мл. 3d-Ado слабее ингибирова АДА в СЖ, как и в случае очищенного фермента [12].

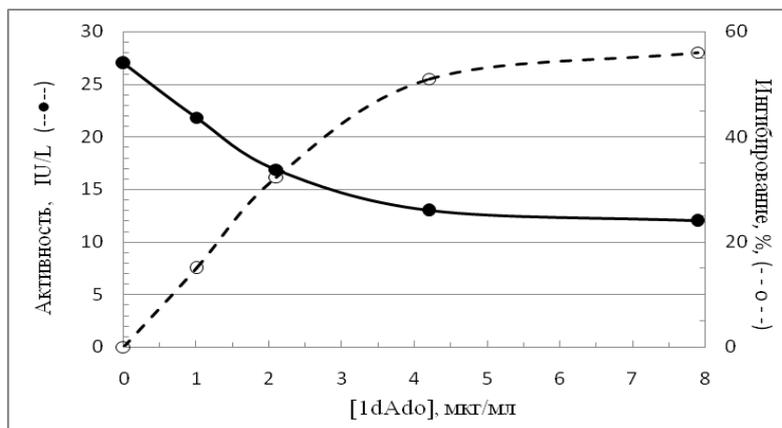


Рис.1. Зависимость активности АДА от концентрации 1d-Ado.

Исследовали также влияние на активность АДА в СЖ классического ингибитора фермента эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил) аденина (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine, EHNA) и двух его производных, 1-деза EHNA (1d-EHNA) и 3-деза EHNA (3d-EHNA).

На рис. 2 представлена зависимость активности АДА и его ингибирования от концентрации EHNA. В наших опытах ингибирование приближается к максимуму при концентрации EHNA 60 нг/мл. Отметим, что ингибирующая эффективность 3d-EHNA для АДА в СЖ, так же как и в случае очищенного АДА, близка к эффективности EHNA, в то время как эффективность 1d-EHNA значительно слабее [10].

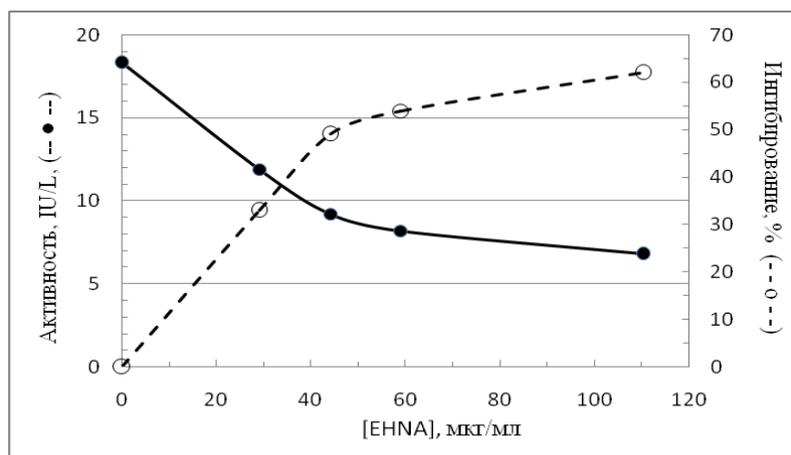


Рис.2 Зависимость активности АДА от концентрации EHNA.

Были исследованы концентрационные зависимости ингибирования фермента в СЖ для всех указанных синтезированных соединений. Из этих зависимостей были определены IC_{50} . Результаты представлены в табл. 1, в которой для сравнения приведены величины IC_{50} для ингибирования АДА, выделенной из плевральной жидкости и плазмы крови человека [10].

Таблица 1. Значения IC_{50} для ингибирования активности АДА синтезированными соединениями

Соединение	IC_{50} , мкг/мл		
	Синовиальная жидкость	Плевральная жидкость [12]	Плазма крови [12]
1dAdo	$5,04 \pm 0,64$	4,43	6,54
3dAdo	964 ± 110	> 2000	1180
EHNA	$0,05 \pm 0,004$	0,074	0,19
1dEHNA	$0,533 \pm 0,09$	1,88	1,11
3dEHNA	$0,056 \pm 0,01$	0,088	0,113

Приведенные в таблице данные свидетельствуют о том, что результаты наших исследований хорошо согласуются с эффективностью ингибирования АДА из других биологических жидкостей человека.

В следующей серии экспериментов было исследовано ингибирование активности АДА в СЖ этанольными экстрактами листьев конского щавеля, виноградных листьев, лепестков розы и надземной части донника лекарственного. На рис. 3 представлено ингибирование (в процентах от исходной активности фермента) исследованными экстрактами в концентрации 0,5 мг/мл.

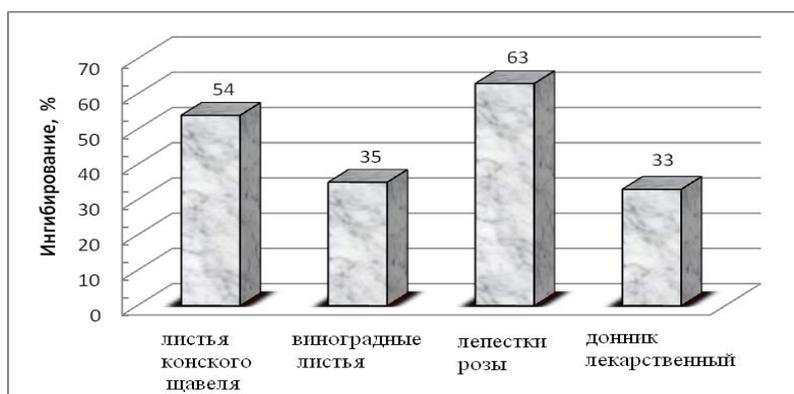


Рис. 3. Ингибирование активности АДА в СЖ экстрактами листьев конского щавеля, виноградных листьев, лепестков розы и донника лекарственного в концентрации 0,5 мг/мл.

Из концентрационных зависимостей ингибирования вычислены IC_{50} для этих экстрактов (табл. 2). Данные табл. 2 подтверждают результаты, представленные на рис. 3: в ингибировании АДА наиболее эффективен экстракт лепестков розы, затем – листьев конского щавеля.

Таблица 2. Величины IC_{50} для ингибирования АДА экстрактами растений

Растение	IC_{50} , мг/мл
листья конского щавеля	$0,42 \pm 0,01$
виноградные листья	$0,65 \pm 0,11$
лепестки розы	$0,22 \pm 0,02$
донник лекарственный	$0,71 \pm 0,1$

В следующей серии экспериментов исследовано ингибирование активности АДА в СЖ выделенными из этанольных экстрактов фракциями, обогащенными определенными биологически активными соединениями [1]. Исследованы зависимости ингибирования фермента от концентрации фракций, проявивших значительную эффективность.

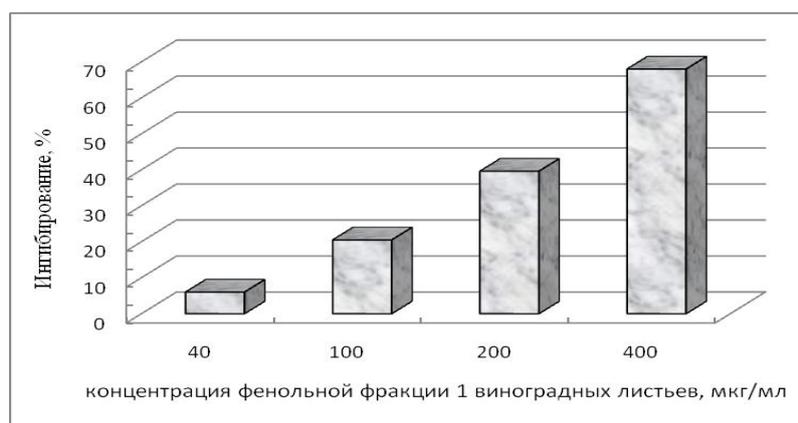


Рис. 4. Ингибирование АДА в СЖ при разных концентрациях фенольной фракции 1 из виноградных листьев.

На рис. 4 представлено ингибирование АДА в СЖ при разных концентрациях фенольной фракции I из экстракта виноградных листьев. Из концентрационных зависимостей вычислены IC_{50} для трех фракций из экстракта листьев конского щавеля, двух фракций из виноградных листьев, и одной фракции из лепестков розы.

В табл. 3 представлены полученные результаты, согласно которым ингибирование активности фермента растительными препаратами обусловлено, в основном, фенольными компонентами. В случае конского щавеля значительный вклад имеют также содержащиеся в нем антраценовые производные.

Таблица 3. IC_{50} ингибирования АДА в СЖ фракциями из растительных экстрактов.

Растение	Фракция	IC_{50} , мкг/мл
Листья конского щавеля	кумариновая	1700 ± 190
	фенольная	$8,1 \pm 0,5$
	антраценовые производные	$36,3 \pm 0,44$
Виноградные листья	фенольная, 1	240 ± 17
	фенольная, 2	160 ± 22
Лепестки розы	фенольная	128 ± 27

В данной работе показано, что в ингибировании активности АДА в СЖ из двух производных аденозина наиболее эффективен 1d-Ado. Из соединений семейства EHNA EHNA и 3d-EHNA близки по эффективности, а 1d-EHNA уступает им на порядок. Интересно, что ингибирующая эффективность фенольной фракции конского щавеля сравнима с эффективностью синтезированного ингибитора 1dAdo.

Результаты описанных исследований свидетельствуют о том, что экстракты используемых в пищу и в народной медицине растений и их компоненты проявляют способность ингибировать АДА, и следовательно могут рассматриваться перспективными противовоспалительными средствами.

На основании проведенных *ex vivo* исследований можно предложить тестирование синтетических и природных ингибиторов АДА в качестве противовоспалительных средств.

Список сокращений

1d-Ado – 1-деза аденозин; 3d-Ado – 3-деза аденозин; 1d-EHNA – 1-деза EHNA; 3d-EHNA – 3-деза EHNA; EHNA – эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)аденин (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine); IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antonyan A., Sharoyan S., Harutyunyan H., Movsisyan N, Sargisova Y., Stepanyan H., Mardanyan S. Cytotoxicity of Some Edible Plants toward Ehrlich Ascites Carcinoma Cells; Research J. of Medicinal Plant, 8, 20-31, 2014.
2. Chan E. S. L., Fernandez P., Cronstein B. N. Adenosine in inflammatory joint diseases. Purinergic Signalling, 3, 145–152, 2007.

3. *Cohen S.B., Gill S.S., Baer G.S., Leo B.M., Scheld W.M., Diduch D.R.* Reduction joint destruction due to septic arthrosis using an adenosine A2A receptor agonist. *J Orthop Res.* 22, 427–35, 2004.
4. *Daddona P.E.* Human adenosine deaminase. *J Biol Chem.*, 256, 12496-12501, 1981.
5. *Majithia V., Geraci S.A.* Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am. J. Med.*, 120 (11), 936 – 939, 2007.
6. *Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S.* Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*; 1, 102–10, 2005.
7. *Nemeth Z.H., Bleich D., Csoka B., et al.* Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *FASEB J.* 21, 2379–88, 2007.
8. *Petersson T., Klockars M., Weber T.H., von Essen R.* Adenosine deaminase activity in joint effusions. *Scand J Rheumatol* 17, 365–9, 1988.
9. *Ratech H., Martiniuk F., Borer W.Z., Rappaport H.* Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. *Blood*, 72, 1627–32, 1988.
10. *Sharoyan S., Antonyan A., Mardanyan S., Lupidi G. Cristalli G.,* Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *Acta Biochimica Polonica*, 53, 539–543, 2006.
11. *Tesch A.M., MacDonald M.H., Kollias-Baker C., Benton H.P.* Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *OAC*, 12, 349–59, 2004.
12. *Zakeri Z., Izadi Sh. Niazi A., Bari Z., Zendeboodi S., Shakiba M., Mashhadi M., Narouie B., Ghasemi-Rad M.* Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med.*, 5(2), 195-200, 2012.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Армения, код #1-21.