

БИОХИМИЯ

УДК 577.152

А.Р. Варданян, В.С. Арутюнян, академик А.А. Аветисян, М.А. Симонян

**Влияние соединения ВАС-167 на уровень эндогенных металлопротеинов
крови крыс при аллоксановом диабете**

(Представлено 9/XII 2005)

Ключевые слова: *аллоксановый диабет, металлопротеины крови, соединение ВАС-167*

Соединение ВАС-167, являющееся производным 4-бутанолида, оказывает антиопухолевый эффект в эксперименте [1] и корректирует липидный и энергетический обмен кардиомиоцитов при ионизирующей радиации, а также глицеринкиназный и гликолитический пути фосфатидогенеза в легочной ткани [2,3]. По предварительным данным, ВАС-167 обладает стабильной СОД-миметической активностью (около 3%) и оказывает высокое противодействие перекиси водорода. Эти свойства дают основание для использования ВАС-167 в качестве возможного регулятора при аллоксан-индуцированном диабете, так как при этой патологии наблюдается существенное увеличение уровня супероксидных радикалов и других форм активного кислорода с нарушением физиологического равновесия между металлопротеинами (МП) крови анти- и прооксидантной активности - регуляторами метаболизма активных форм кислорода (АФК) [4,5]. При этом ферменты антиоксидантной активности (СОД, каталаза) при аллоксановом диабете (АД) оказывают антидиабетическое воздействие [6-8]. Однако эффективность, рентабельность, время полураспада и проникновения через биомембраны этих ферментов после введения в организм недостаточны [8]. ВАС-167 гидрофобное соединение, вероятность проникновения которого через биомембраны (включая и эритроцитарные) значительна.

Цель работы состоит в определении эффективности воздействия соединения ВАС-167 на выживаемость крыс и на эндогенные уровни МП анти-

и прооксидантной активности крови крыс при аллоксан-индуцированном диабете.

Исследование проводили на 32 белых крысах массой 180-220 г. Аллоксановый диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением аллоксана ("Sigma") в дозе 150 мг/кг массы животного. Животные были подразделены на группы (по 16 крыс в каждой): интактные (К), 15-дневные аллоксандиабетические (опытная группа 1, ОГ-1), аллоксандиабетические с трехкратным введением (по 1 мл) ВАС-167 (1 мл, 5 мг/кг) через каждые 3 дня (ОГ-2). МП антиоксидантной активности (МАО) и МП прооксидантной активности (МПА) получали из крови животных испытываемых групп. МАО (Cu,Zn-СОД и каталаза - из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) - из сыворотки крови) и МПА (цитохром (цит)b5 - из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цитохрома b558 I-IV - из сыворотки крови и эритроцитарных мембран (ЭМ), а также O_2^- -продуцирующий липопротеин сыворотки - супрол) выделяли и очищали биотехнологическим способом путем ионообменной хроматографии белковых фракций сыворотки, растворимой части эритроцитов и ЭМ на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52, сефадексе ДЕАЕ А-50 и гель-фильтрации на сефадексе G-100 [9]. Цит b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [10]. Количество МП определяли путем измерения характерной для данного белка плотности максимального оптического поглощения: для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b558 при 530, супрола - 430, ЦП - 610 и ТФ - 470 нм. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и супероксид-продуцирующую активность цит b558III и супрола определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [11] путем измерения процента ингибирования (для СОД) или увеличения (для супрола и цит b558III) образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД-активности принимали количество фермента, снижающее продуцирование формазана (при 560 нм) на 50%. Удельную СОД-активность определяли в расчете на 1 мл эритроцитов. За единицу НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b558III и супрола принимали количество белков, повышающее образование формазана на 50%. Удельная O_2^- -продуцирующая активность для цит b558III была рассчитана на 1 мл эритроцитов, а для супрола - на 1 мл сыворотки. Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит b558III [11] определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения альфа-полосы (при 565 нм) мет Hb (ферриHb- Fe^{+3}) в течение 4-8 ч при 30°. Такое снижение плотности поглощения альфа-полосы прямо пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферроHb (Fe^{+2} -

Hb) при 555 нм. За единицу метHb-восстанавливающей активности цит b558III принимали количество гемопroteина, уменьшающее интенсивность плотности альфа-полосы до 0.05 в течение 30 мин при 30°. Удельная метHb-восстанавливающая активность цит b558III была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. При определении метHb-восстанавливающей активности цит b558III в гомогенной фазе величина плотности поглощения изолированного цит b558III (A530) в реакционной смеси (3 мл) составляла 0.02. Процедура определения метHb-восстанавливающей активности такова: непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 2.5 мл свежеполученного метHb добавляли 0.5 мл изолированного цит b558III. После быстрого смешивания реакционную смесь оставляли в покое и без перемешивания регистрировали снижение плотности альфа-поглощения метHb при указанных выше условиях. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности.

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня и активности МАА и МПА в ОГ-1 и ОГ-2 по сравнению с 100%-ными контрольными показателями ($P < 0.05$, $n = 8$).

МП и активность	ОГ-1	ОГ-2
Цит b5	+ 37.1 +/- 3.6	+ 13.9 +/- 2.1
Сумма цит b558I + b558II	-23.4 +/- 1.9	-15.3 +/- 1.3
Цит b558III	-35.6 +/- 3.1	- 21.5 +/- 2.0
Цит 558IV	-40.0 +/- 3.9	+ 4.1 +/- 0.8
O ₂ -продуцирующая активность цит b558III	+ 28.1 +/- 2.2	+ 20.3 +/- 2.2
МетHb-восстанавливающая активность цит b558III	+ 23.5 +/- 1.8	+ 12.3 +/- 1.1
Супрол	+ 19.5 +/- 2.0	+ 21.3 +/- 3.1
O ₂ -продуцирующая активность супрола	+ 60.2 +/- 4.9	+ 10.1 +/- 0.5
ЦП	-44.5 +/- 4.2	-13.1 +/- 1.9
ТФ	+ 4.7 +/- 0.2	+ 11.2 +/- 0.4
Cu,Zn- СОД	+ 10.4 +/- 0.3	+ 18.4 +/- 2.3
Каталаза	-45.7 +/- 2.4	-38.4 +/- 4.1

При 15-дневном аллоксановом диабете МАА и МПА крови претерпевают не только характерные количественные, но и качественные изменения (табл.1). Наблюдается повышение эндогенного уровня цит b5 (ОГ-1) в растворимой фракции эритроцитов (цит b5 является переносчиком электрона для метHb редуктазной системы), что может быть результатом потери

животными подвижности (гипокинезия) [12]. Снижение уровня изоформ сывороточных цит b558 может быть связано с повышением их расходования при нейтрализации повышенного уровня перекиси водорода. Эффект снижения уровня цит b558I и b558II при АД также связан с увеличением уровня перекиси водорода в эритроцитах (перекись водорода необратимо деградирует цит b558III и b558IV [13]). Однако снижение уровня цит 558 ЭМ компенсируется некоторым повышением НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности этого гемопро-теина. В описанных условиях повышение супероксид-продуцирующей активности намного больше, чем прирост эндогенного уровня супрола. Это может быть связано со стимулированием липидной пероксидации супрола при АД. С другой стороны, существенно снижается и стабильность супрола (супрол переходит в нерастворимое состояние уже через 2 ч). В ОГ-1 значительное снижение уровня ЦП (ключевого белка острой фазы [6]) существенно снижает антирадикальную защиту сыворотки. На этом фоне уровень ТФ практически не меняется. Активности ключевых ферментов антиоксидантной активности эритроцитов - Cu,Zn-СОД и каталазы изменяются неадекватно. Небольшое повышение активности Cu,Zn -СОД происходит на фоне заметного снижения активности каталазы, что отрицательно воздействует на состояние остальных МП крови анти- и прооксидантной активности, так как нарушение метаболизма перекиси водорода, ее накопление стимулирует деградацию этих МП. Это влияет на антиоксидантный статус АС - расчетный суммарный уровень МАА и прооксидантный статус (ПС) - расчетный суммарный уровень МПА сыворотки и эритроцитов (табл.2). Если в сыворотке дисбаланс между МАА и МПА существенный, то в эритроцитах АС и ПС различаются незначительно (снижены по сравнению с нормой). Нарушение физиологического равновесия между АС и ПС при АД вызывает оксидативное повреждение крови и гибель животных ($23.2 \pm 1.8\%$) в приведенном режиме АД.

Таблица 2

Относительное изменение (%) уровня АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов в ОГ-1 и ОГ-2 по сравнению с 100% - ными контрольными показателями ($P < 0.05$, $n = 8$)

Компоненты крови	ОГ-1		ОГ-2	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	-39.8 $\pm$ 2.7	+ 79.7 $\pm$ 5.1	- 1.9 $\pm$ 0.2	+ 31.4 $\pm$ 2.3
Эритроциты	-25.7 $\pm$ 2.4	-33.8 $\pm$ 2.7	-20.0 $\pm$ 1.4	+ 4.5 $\pm$ 0.6

В ОГ-2 под воздействием экзогенно введенного соединения ВАС-167 в большинстве случаев наблюдается приближение к контрольным показателям уровня и активности МАА и МПА. Это улучшает кислородный гомеостаз и гемодинамику, снижая степень агрегации эритроцитов и гемопротеиновых компонентов эритроцитов. Повышается и стабильность супрола. В результате этого гибель животных снижается и составляет всего 8 - 9%. При этом АС в сыворотке крови практически нормализуется (табл.2), хотя ПС оставался пока выше нормы. В эритроцитах наблюдается некоторое снижение АС и практически нормализация ПС. Однако под воздействием ВАС-167, обладающего около 3% СОД-миметической активностью и в основном положительно влияющего на метаболизм регуляторных АФК МП, уровень каталазы остается пока еще значительно ниже нормы. Видимо, это обстоятельство и препятствует полному регулированию эндогенных уровней МП крови. Отсюда вытекает необходимость компенсации снижения эндогенного уровня каталазы введением экзогенной каталазы, желательно отдельно от ВАС-167, несколько денатурирующего этот фермент. Таким образом, соединение ВАС-167 оказывает определенное регуляторное воздействие на уровень и активность МАА и МПА при АД, оставляя практически сниженным уровень каталазы, что можно компенсировать комбинацией ВАС-167 и экзогенной каталазы.

Институт биохимии им.Г.Х. Бунятына НАН РА
Ереванский государственный университет

**Ն.Ռ. Վարդանյան, Վ.Ս. Նարությունյան, ակադեմիկոս Ա.Ա. Ավերիսյան,
Մ.Ա. Սիմոնյան**

**ՎԱՍ-167 միացության ազդեցությունը առնետների արյան մեքաղապրոպեինների
էնդոգեն մակարդակի վրա արոսանային շաքարախորի ժամանակ**

ՎԱՍ-167 միացությունը (ներորովայնային եռակի ներարկումով, 5մգ/կգ չափաբաժնով) ցուցաբերում է կարգավորիչ ազդեցություն առնետների արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մեքաղապրոպեինների էնդոգեն մակարդակի և ակտիվության վրա՝ կրճատելով մահացող կենդանիների թիվը: Այնուհանդերձ կարալազի մակարդակը դեռևս մնում է նորմայից ցածր:

The Influence of VAS-167 Compound on the Level of Endogenous Metalloproteins of Rat Blood at Alloxan Diabetes

The VAS-167 compound (injected intraperitoneally 3 times at the dose of 5 mg/kg) indicates the regulating effect on the endogenous level and activity of rat blood anti- and prooxidative activity of metalloproteins at 15 days alloxan diabetes, simultaneously decreases the number of death of the animals. However the level of catalase in the main still is lower in comparison with the norm.

Литература

1. Арутюнян В.С., Кочикян Т.В., Аветисян А.А., Кинзирский А.С. В кн.: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. МЗ РА и Гематологический центр им. Р.Еяна. Ереван. 1998. С. 409-411.
2. Казарян П.А., Саакян Л.С., Егиазарян А.Р., Григорян А.Г., Бегларян М.К. - Ученые записки ЕГУ. 2002. Т.1. С. 86-89.
3. Shaakyan R.Kh., Kazaryan P.A., Avetisyan A.A. - 3-rd young medics' Intern. conf. Yerevan 2005. P. 160.
4. Варданян А.Р., Геворкян Д.Н., Агаджанов М.И., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 1999. Т.39. С. 38-42.
5. Варданян А.Р., Геворкян Д.Н., Агаджанов М.И., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 2000. Т.40. С. 20-22.
6. Мжельская Т.И. - Бюлл. эксп. биол. мед. 2000. Т.130. С.124-133.
7. Granqvist K. - Nature. 1981. V.254. P.158-162.
8. Gandy S.E. - J.Clin. Invest. 1982. V.70. P.650-659.
9. Симонян М.А., Симонян Г.М. - Лицензия изобрет. Армпатента N 341. Ереван. 1997.
10. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. - Лицензия изобрет. Армпатента N 908. Ереван. 2001.
11. Симонян М.А., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 2004. Т. 44. С. 43-46.
12. Манукян И.А., Симонян М.А., Симонян Р.М., Симонян Г.М. - Эксп. клин. фармакология. 2004. Т.1. С. 28-31.
13. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Ереванского гос. мед. ун-та. 1999. С. 48-51.