

УДК 577.612.327. 324

Р. Х. Саакян, П. А. Казарян, академик А. А. Аветисян, М. А. Симонян

Супероксиддисмутаза-миметическая активность соединения ВАС-167 и его воздействие на металлопротеины крови *in vitro*

(Представлено 30/XI 2005)

Ключевые слова: *соединение ВАС-167, металлопротеины, супероксиддисмутаза*

Соединение ВАС-167, являясь производным 4-бутанолида, оказывает противоопухолевый эффект в эксперименте [1], корригирует глицерокиназный и гликолитический пути фосфатидогенеза в легочной ткани [2], а также липидный и энергетический обмен кардиомиоцитов при ионизирующей радиации [3,4]. Однако молекулярно-биохимические механизмы воздействия соединения ВАС-167 на металлопротеины (МП) крови пока не установлены.

Цель работы заключается в выявлении возможной антиоксидантной активности соединения ВАС-167 и его воздействия на состояние МП крови - регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК) *in vitro*.

Порошок соединения ВАС-167 (50 мг) был растворен в 10 мл этанола при 40-45° в течение 15-20 мин (этот матричный раствор использовали в дальнейшем). МП донорской крови антиоксидантной активности (МАО) (Cu,Zn-СОД, церулоплазмин (ЦП), трансферрин (ТФ) и каталаза) и металлопротеины прооксидантной активности (МПА) (цитохром (цит) b558III, выделенный из эритроцитарных мембран (ЭМ), и супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки - супрол)) получали и очищали биотехнологическим способом с использованием ионообменной хроматографии (на целлюлозах ДЕ-52, КМ-52, ДЕАЕ А-50) и гель-фильтрации (на сефадексах G-75 и G-100) до электрофоретически гомогенного состояния [5] без использования детергента для солюбилизации белков из ЭМ [6].

Супероксиддисмутазную (СОД) активность проб определяли методом: 1) нитротетразолиевого синего (НТС), основанным на определении процента понижения плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образовавшегося в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД активности принимали количество фермента (проба), подавляющее образование формазана на 50% [7]; 2) обоснования кумасии бриллианта синего (КБС) супероксидными радикалами (при 580 нм), продуцируемыми расщеплением перекиси водорода при pH 7.4 и выше [8]; 3) количественного определения стационарной концентрации O_2^- , продуцируемых при расщеплении перекиси водорода (при pH 8) путем расчета интегральной интенсивности характерного для O_2^- ЭПР спектра с $g = 2.02$ (фактор Ланде) и сравнения с аналогичными

показателями другого парамагнетика с известной концентрацией (5×10^{-4} М CuCl_2) [9].

Определенные количества МАА и МПА (по 3 мл) в отдельности были смешаны с 0.025 мг/мл ВАС-167, растворенным в этаноле, и инкубированы в течение трех суток при 4° в аэробных условиях. К контрольным пробам был добавлен этанол в тех же количествах. Каталазную активность проб определяли перманганатометрическим титрованием путем расчета концентрации расщепленной перекиси водорода за 1 мин при 20° определенным количеством каталазы. НАДРН-зависимую O_2^- -продуцирующую активность цит b58III [10] и супрола [11] определяли НТС-методом в отсутствие и присутствии ВАС-167, рассчитав процент увеличения плотности максимального оптического поглощения формазана под воздействием определенных количеств белков. За единицу O_2^- -продуцирующей активности принимали количество белка, вызывающее 50%-ное увеличение плотности оптического поглощения формазана (при 560 нм). Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающую активность цит b558III в отсутствие и присутствии ВАС-167 определяли путем расчета снижения плотности альфа-поглощения (заштрихованная часть спектра) метНб ($A_{565} = 0.9$) под воздействием цит b558III (плотность оптического поглощения цит b558III при 530 нм в 3 мл реакционной смеси составляла 0.02) после суточного инкубирования реакционной смеси при 4° , затем при 30° в течение 5 ч [12].

Оптические спектры поглощения проб регистрировали на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пробега 1 см при 20° . ЭПР-спектры проб регистрировали на спектрометре "Varian E-9" (США) при температуре жидкого азота- 196°C . Условия регистрирования ЭПР спектров таковы: чувствительность записи спектров 10^3 , модуляция амплитуды 10 Гаусс, микроволновая частота 9.08 ГГц, микроволновая мощность 10 мв, постоянная времени 0.3 с, напряженность постоянного магнитного поля 3000 Гаусс.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности. Расчеты показали, что СОД-миметическая активность соединения ВАС-167 составляет около 3% (сравнивается с активностью Cu,Zn-SOD , составляющей 3000 ед/мг). Это довольно высокий показатель для СОД-миметических комплексов [13]. СОД-миметическая активность ВАС-167 не подавляется при хранении препарата в этаноле при 4° в течение месяца и более. Преимущество ВАС-167 по сравнению с Cu,Zn-SOD состоит в том, что перекись водорода (уровень этого активного соединения кислорода почти всегда повышается при различных заболеваниях) не подавляет его СОД-миметическую активность, как это имеет место при Cu,Zn-SOD , который в присутствии этой перекиси после дисмутирования супероксидов уже более интенсивно продуцирует их из-за восстановления меди в активном центре фермента [14]. Процесс обесцвечивания КБС супероксидными радикалами, продуцируемыми при расщеплении перекиси водорода (10^{-3} М) при pH 8, существенно подавляется под воздействием 0.025 мг/мл ВАС-167 или каталитических количеств Cu,Zn-SOD (5×10^{-8} М) (рис. 1). ВАС-167, а также Cu,Zn-SOD снижают интегральную интенсивность ЭПР сигнала O_2^-

(рис. 2) в приведенной системе продуцирования супероксидов. Можно констатировать, что соединение ВАС-167 обладает стабильной СОД-миметической активностью и не денатурируется перекисью водорода, уровень которой существенно повышается при оксидативном стрессе различного характера [13].

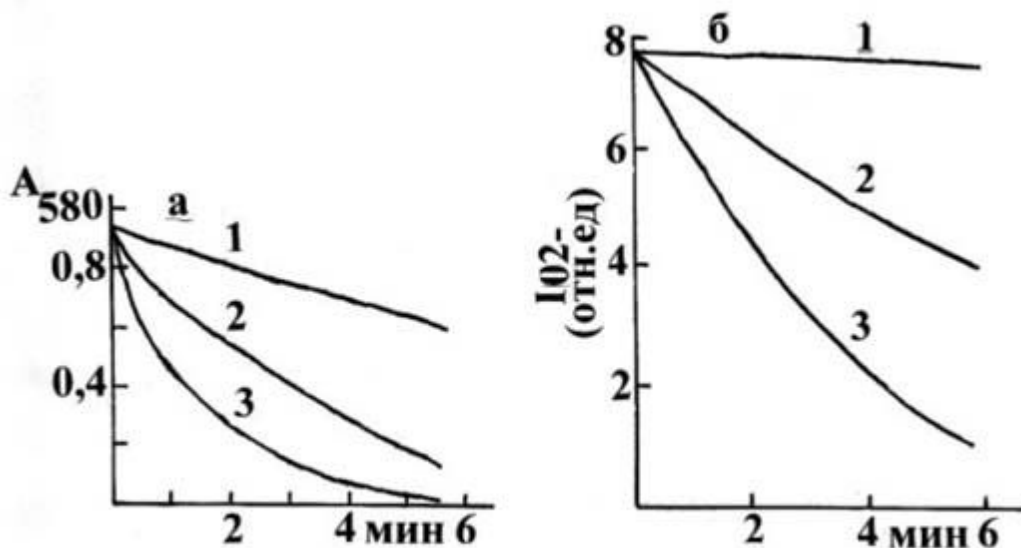


Рис. 1. Кинетические характеристики улавливания супероксидных радикалов. а - Кинетические кривые обесцвечивания КБС супероксидными радикалами (3). То же в присутствии 5×10^{-8} М Cu,Zn-СОД (2) и 0.025 мг/мл ВАС-167 (1). б - Кинетические кривые снижения интегральной интенсивности ЭПР сигнала O_2^- (в относительных единицах) в присутствии 0.025 мг/мл ВАС-167 (3) и 5×10^{-8} М Cu,Zn-СОД (2) и в их отсутствии (1)

Немаловажное значение имеет и то, что ВАС-167 практически не изменяет свойств (оптико-спектральные характеристики) ряда ключевых МАА: ЦП, ТФ (рис.3), а также Cu,Zn-СОД при инкубировании ВАС-167 (0.025 мг/мл) с этими МП в течение трех суток при 4°. Не меняются и свойства (оптико-спектральные показатели) новых МПА - цит b558III и супрола (рис.3), не подавляется и их супероксид-продуцирующая активность *in vitro*.

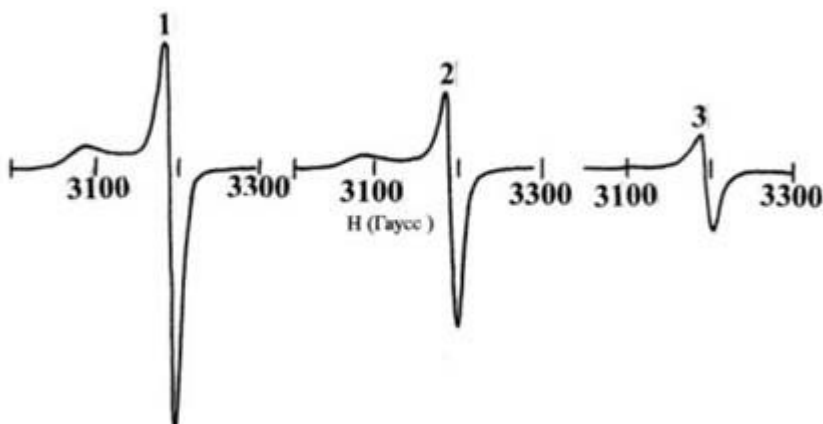


Рис. 2. Изменение ЭПР показателей супероксидных радикалов в системе перекиси водорода. ЭПР спектры O_2^- , полученные при расщеплении 10^{-3} М перекиси водорода при pH 8 (1), в присутствии 5×10^{-8} М Cu,Zn-СОД (2) и 0.025 мг/мл ВАС-167 (3). Время инкубирования реакционной смеси 10 мин при 25°

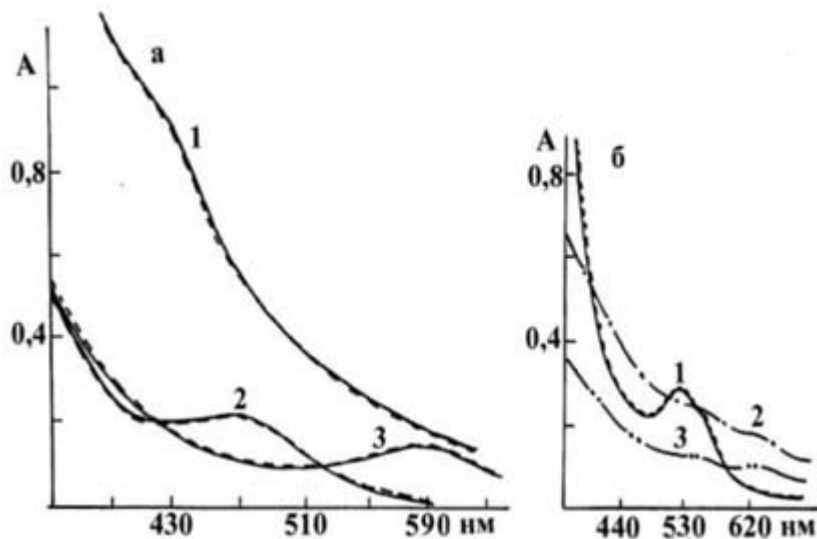


Рис. 3. Воздействие препарата ВАС-167 на оптические спектральные показатели металлопротеинов.
а - оптические спектры поглощения супрола (1), ТФ (2) и ЦП (3) в отсутствие (сплошные линии) и присутствии (пунктирные линии) 0.025 мг/мл ВАС-167;
б - то же для цит b558III (1) и каталазы (3) и (2).

Однако ВАС-167 несколько подавляет активность каталазы (12.2 ± 1.1 , $P < 0.05$, $n = 8$), вызывая небольшую деградацию этого фермента (рис. 2), и метНб-восстанавливающую активность цит b558III (15.4 ± 1.2 , $P < 0.05$, $n = 8$) (рис.4), что нежелательно, так как при анемии (при злокачественных новообразованиях [15]) происходит повышение уровня метНб, который не способен перенести кислород к клеткам. Соединение ВАС-167 не снижает супероксид-продуцирующую активность супрола и НАДРН-зависимую супероксид-продуцирующую активность цит b558III. В отличие от Cu,Zn-СОД ВАС-167 не инактивируется перекисью водорода и улавливает супероксидные радикалы, продуцируемые при расщеплении этой перекиси. Соединение ВАС-167 в подавляющем большинстве не денатурирует МАА и МПА и обладает антиоксидантной активностью. Однако поскольку исследования осуществлены в условиях *in vitro*, пока трудно определить, как влияет ВАС-167 *in vivo* на такое свойство цит b558III.

Таким образом, препарат ВАС-167 как антиоксидант оказывает положительное регулирующее воздействие при оксидативном стрессе различного характера, при котором наблюдается повышение прооксидантного статуса организма.

Институт гематологии МЗ РА
Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыан НАН РА
Ереванский государственный университет

Литература

1. Арутюнян В. С., Кочикян Т. В., Аветисян А. А., Кинзирский А. С. В кн.: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Ереван. 1998. С. 409-412.
2. Казарян П. А., Саакян Л. С., Егиазарян А. Р., Григорян А. Г., Бегларян М. К. - Ученые записки ЕГУ. 2002. Т. 1. С. 86.
3. Егиазарян А. Р. - Материалы 3-го конгресса онкологов закавказских государств. МЗ РА и Онкол. центр МЗ РА. Ереван. 2004. С. 102.
4. Sahakyan R. Kh., Kazaryan P. A., Avetisyan A. A. - 3-rd young medics' Intern.Conf. Yerevan. 2005. P. 160.
5. Симонян М. А., Симонян Г. М. - Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван. 1997.
6. Симонян Г. М., Симонян Р. М., Симонян М. А. - Лицензия изобрет. № 908 Армпатента, Ереван. 2001.
7. Nishikimi M., Rao N. A. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. V. 64. P. 949-956.
8. Simonyan M. A., Nalbandyan R. M. - Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 583. P.279-286.
9. Simonyan M. A. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 108. P. 1751-1758.
10. Симонян М. А., Симонян Р. М., Бабаян М. А. - Мед. наука Армении. 2003. Т. 42. № 1. С. 33-35.
11. Симонян М. А., Карапетян А. В., Бабаян М. А., Симонян Р. М. - Биохимия. 1996. Т. 61. № 5. С. 932-941.
12. Симонян Р. М., Симонян Г. М., Бабаян М. А., Симонян М. А. - Мед. наука Армении. 2004. Т. 44. № 1. С. 43-48.
13. Симонян Р.М. Новые факторы оксидативного повреждения компонентов крови. Автореф. канд. дис. Ереван. 2004.
14. Fridovich I. - Annu Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 97-112.
15. Della R. F., Granata A., Brocco M. - Anticancer. Res. 1995. V. 15. P. 2089-2096.

Ռ. Խ. Սահակյան, Պ. Ա. Ղազարյան, ակադեմիկոս Ա. Ա. Ավետիսյան, Մ. Ա. Միմոնյան

**ՎԱՍ-167 միացության սուպերօքսիդիդիսմուտազ-միմետիկական ակտիվությունը և նրա
ազդեցությունը արյան մետաղապրոտեինների վրա**

ՎԱՍ-167-ը (4-բութանոլիդի ածանցյալ) օժտված է ՍՕԴ-միմետիկական ակտիվությամբ ($3.1 \pm 0.06\%$, $p < 0.03$, $n = 8$): ՎԱՍ-167-ը չի փոփոխում հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ցերուլոպլազմին, տրանսֆերրին և Cu, Zn-SOD) և պրօօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ցիտոքրոմ (ցիտ.) b558 III, և սուպրոլ) օպտիկական-սպեկտրալ հատկությունները՝ in vitro պայմաններում 3 օր 4° ինկուբացումից հետո: ՎԱՍ-167-ը մի փոքր նվազեցնում է ցիտ. b558III-ի և մետհեմոգլոբինի վերականգնման և կատալազի ակտիվություններն ու չի ազդում ցիտ. b558III-ի և սուպրոլի O_2^- - գոյացնելու ակտիվությունների վրա: ՎԱՍ-167-ը չի ակտիվազրկվում ջրածնի պերօքսիդից: Այսպիսով, ՎԱՍ-167-ը մեծ մասամբ չի քայքայում վերոհիշյալ մետաղապրոտեինները in vitro և ունի հակաօքսիդանտային ակտիվություն:

R. Kh. Sahakyan, P. A. Ghazaryan, academician A. A. Avetissyan, M. A. Simonyan

**Superoxide Dismutase-mimetic Activity of the Compound VAS-167 and
its Influence on the Blood's Metalloproteins in vitro**

The compound VAS-167 (the derivative of 4-butanoloide) possesses SOD-mimetic activity ($3.1 \pm 0.06\%$, $p < 0.03$, $n = 8$). The VAS-167 doesn't change the optico-spectral indices of the antioxidative activity metalloproteins (ceruloplasmin, transferrin and Cu,Zn-SOD) and prooxidative activity metalloproteins (cytochrome b558III, and suprol), after its incubation during 3 days at 40 in vitro. VAS - 167 slightly decreases the metHb-reducing activity of cyt b558III and catalases activity, doesn't affect the O_2^- - producing activity of cyt b558 III and suprol. VAS -167 is not activated under the influence of H_2O_2 . Thus, the VAS-167 in most cases doesn't degradate the abovementioned metalloproteins and has antioxidative activity.