

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО β-ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННОГО АНАЛОГА α-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

¹Саакян Л. Ю., ²Симонян Г. М., ²Симонян Р. М., ²Симонян М. А., ¹Секоян Э. С., ¹Сагян А. С.

¹ *Институт Фармации Ереванского государственного университета
Армения, 0025 Ереван, ул. А. Манукяна, 1, E-mail: lusine_sahakyan@ysu.am*
² *Институт биохимии им. акад. Г.Х. Бунятыана НАН РА, Ереван*

Изучены антиоксидантная активность нового β-гетероциклически замещенного аналога α-аминомасляной кислоты с наличием в 3 и 4 положениях 1,2,4-триазольного цикла пропил-, и бутильные заместители - (2*S*, 3*S*)-β-[3-бутил-4-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аминомасляная кислота (β-АМК-789) и ее действие на процессы Нб-индуцируемого релизинга суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox) из мембран митохондрий печени. Установлено что β-АМК-789 обнаруживает концентрация-зависимое антиоксидантное действие за счет наличия СОД-миметической активности. Выявлено, что β-АМК-789 в концентрации 0,3 мг/мл значительно снижает интенсивность Нб-индуцирующего релизинга суммарной фракции изоформ Nox1 и Nox2, не влияя на их оптические спектральные характеристики. Под влиянием β-АМК-789 статистически значимо снижется плотность β-поглощения отщепленных изоформ Nox1 и Nox2 при 560 нм, что свидетельствует о наличии у нового β-гетероциклически замещенного аналога α-аминомасляной кислоты мембраностабилизирующего действия.

α-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ՆՈՐ, β-ՀԵՏԵՐՈՑԻԿԼԻԿ ՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ԱԾԱՆՑՅԱԼԻ ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԹԱՂԱՆԹԱԿԱՑՈՒՆԱՑՆՈՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

¹Սահակյան Լ. Յու., ²Միմոնյան Գ. Մ., ²Միմոնյան Ռ. Մ., ²Միմոնյան Մ. Ա., ¹Սեկոյան Է. Մ., ¹Սաղյան Ա. Ս.

Ուսումնասիրվել են 1,2,4-տրիազոլային ցիկլի 3-րդ և 4-րդ դիրքերում պրոպիլ և բուրիլ տեղակալիչներ պարունակող β-հետերոցիկլիկ տեղակալված α-ամինակարագաթթվի նոր ածանցյալի՝ (2*S*, 3*S*)-β-[3-բուրիլ-4-պրոպիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ամինակարագաթթվի (β-ԱԿԹ-789) հակաօքսիդանտային ակտիվությունը և նրա ազդեցությունը լյարդի միտոքոնդրիումների թաղանթներից NADPH օքսիդազի (Nox) իզոմերների գումարային ֆրակցիայի Hb-ով հարուցված արտազատման (ռիլիզինգի) գործընթացի վրա: Հաստատվել է, որ β-ԱԿԹ-789 ցուցաբերում է խտություն-կախյալ հակաօքսիդանտային ազդեցություն, շնորհիվ ՍՕԴ-միմետիկ ակտիվության: Հայտնաբերվել է, որ β-ԱԿԹ-789-ը 0,3 մգ/մլ չափաբաժնով զգալիորեն նվազեցնում է Nox1 և Nox2 իզոմերների գումարային ֆրակցիայի Hb-ով հարուցված արտազատման ինտենսիվությունը, չազդելով դրանց օպտիկական սպեկտրալ հատկանիշների վրա: β-

ԱԿԹ-789-ի ազդեցությամբ վիճակագրորեն նշանակալի ձևով նվազում է անջատված Nox1 և Nox2 իզոմերների β -կլանման խտությունը՝ 560 նմ-ում, ինչը վկայում է α -ամինակարազաթթվի նոր, β -հետերոցիկլիկ տեղակալված ածանցյալի թաղանթակայունացնող հատկության մասին:

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND MECHANISMS OF MEMBRANE-STABILIZING ACTION OF A NEW β -HETEROCYCLIC SUBSTITUTED ANALOGUE OF α -AMINOBUTYRIC ACID

¹Sahakyan L.Yu., ²Simonyan G.M., ²Simonyan R.M., ²Simonyan M.A., ¹Sekoyan E.S., ¹Sagyan A.S.

There has been studied an antioxidant activity of a new β -heterocyclic substituted analogue of α -aminobutyric acid with existence in 3 and 4 positions of 1,2,4-triazole cycle of propyl-, and butyl substituents - (2S, 3S) - β - [3-butyl-4- propyl) -5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl] - α -aminobutyric acid (β -ABA-789) and its action upon the processes of Hb-induced releasing of a total fraction of NADPH oxidase isoform (Nox) from the membranes of liver mitochondria. It was established that β -ABA-789 detects concentration-dependent antioxidant effect due to existence of SOD-mimetic activity. It was revealed that β -ABA-789 in 0.3 mg / ml concentration significantly reduced an intensity of Hb-induced releasing of total fraction of Nox1 and Nox2 isoforms without affecting upon their optical spectral characteristics. Under an influence of β -ABA-789 there significantly decreases the density of beta-absorption of the chipped-off Nox1 Nox2 isoforms at 560 nm testifying existence of membrane stabilizing action in a new β -heterocyclic-substituted analogue of α -aminobutyric acid.

Введение В последнее время внимание исследователей все более привлекают небелковые α -аминокислоты, которые не обнаруживаются в белковой цепи, не имеют соответствующих транспортных РНК и кодового триплета или не появляются среди белковых аминокислот в процессе посттрансляционных модификаций. Среди небелковых аминокислот особе внимание привлекают β -гетероциклически замещенные α -аминокислоты, которые являются чужеродными как по структуре, так и по природе гетероатомов [1]. Особый интерес представляют соединения на основе 1,2,4-триазолов. В частности в настоящее время существует ряд лекарственных средств, содержащих в структуре триазольные фрагменты, обладающих противовирусным, антигрибковым, цитостатическим и антидепрессивным действием [10]. Допускается, что биологическую активность могут проявлять производные α -аминомасляной кислоты с содержанием в

боковом радиакле триазольных заместителей, которые могут обладать физиологической активностью как за счет гетероцикла, так и за счет аминокислоты [7]. Интерес к подобным соединениям обусловлен также присутствием в их структуре второго хирального центра, что открывает широкие возможности для получения стереоизомеров, с новыми физиологическими свойствами. Ранее были синтезированы 1,2,4-триазолсодержащие гетероциклически замещенные производные (2S,3S)-allo- α -аминомасляной кислоты, содержащих в положениях 3 и 4 триазольного цикла различные радикалы [2-4]. С использованием ранее разработанной методологии на кафедре фармхимии и фармакогнозии Института Фармации ЕГУ был синтезирован новый β -гетероциклически замещенный аналог α -аминомасляной кислоты с наличием в 3 и 4 положениях 1,2,4-триазольного цикла пропил-, и бутильные заместители - (2S, 3S)- β -[3-бутил-4-пропил]-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аминомасляная кислота (β -АМК-789).

Исходными предпосылками для изучения влияния β -АМК-789 на процессы рилизинга NADPH оксидазы (Nox) из митохондриальных мембран явилось следующие данные. Выявлено, что ключевым фактором и пусковым механизмом дестабилизации мембранных структур является активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) индуцированное супероксидными радикалами (O_2^-) и их производными. Следующий этап дестабилизации – активация процесса Hb -индуцированного рилизинга Nox из биомембран [11, 12]. Открытие процесса избирательного комплексообразования Hb с изоформами NADPH оксидазы (Nox) [8] явилось началом разворачивания исследований по изучению стабильности цитоплазматической и внутриклеточных мембран. Выявлено, что в условиях ПОЛ и увеличения текучести биомембран повышается степень проникновения Hb в их поверхностные слои с образованием его избирательного, но нестабильного, комплекса с локализованными в мембранных структурах изоформами Nox, которые в последующем высвобождаются в растворимую фазу. Принимая во внимание, что изоформы Nox являются важными компонентами биомембран, участвующими в механизмах регуляции функции митохондрий, иммунной системы, экспрессии гена и др., [6, 9], изыскание средств, способных ингибировать процесс рилизинга изоформ Nox из биомембран следует рассматривать в качестве одного из перспективных направлений в области биомедицины и фармации.

Целью настоящего исследования являлось изучение антиоксидантной активности β -АМК-789 и ее действия на процессы Нв-индуцируемого рилизинга суммарной фракции изоформ Nox из митохондриальных мембран.

Материалы и методы С целью определения антиоксидантной (СОД-миметической) активности β -АМК-789 были использованы химически чистые перекись водорода, КОН, кумасси бриллиантовый синий (КБС), одно- и двухзамещенные соли фосфорнокислого калия, а также электрофоретически гомогенные препараты Cu,Zn-СОД и каталаза, выделенные и очищенные из печени быка [5]. Для проведения ионообменной хроматографии фракций Nox использовали целлюлозу DE-52 (*“Whatman”, Англия*), для гель-фильтрации - сефадекс G-100 (*“Pharmacia”, Швеция*). Электрофорез раствора Nox осуществляли на 10% полиакриламидном геле, в течение 1,5 ч. Концентрацию перекиси водорода определяли перманганометрическим титрованием, концентрацию КБС (М) – используя величину молярного поглощения при 580 нм.

Для образования O_2^- к 10 мл 0,1 М H_2O_2 добавляли 10 мл 0,1 М КОН (*pH 9,5*). Раствор нагревали 20-25 сек при 50-60°C; далее происходила экзотермическая реакция расщепления H_2O_2 с образованием O_2^- . Через 2-3 мин при комнатной температуре определяли стационарную концентрацию образованных O_2^- путем добавления последних (по 0,1 мл) к 5 мл раствора КБС. В результате наблюдалось восстановление КБС супероксидными радикалами со снижением плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм, при этом, обесцвечивание КБС супероксидными радикалами происходило стехиометрично. Рассчитывалось количество O_2^- (М), восстанавливающее 1 М КБС в течение определенного промежутка времени (молярная экстинкция КБС составляет $43.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Процесс подобного обесцвечивания КБС подавляется под влиянием $5 \cdot 10^{-8}$ М Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) или каталазы [13].

СОД-миметическую активность β -АМК-789 определяли оптическим спектральным методом, путем сравнения процента снижения плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм под влиянием образовавшихся при расщеплении H_2O_2 супероксидов в контроле и в присутствии β -АМК-789 (в течение 25-30 мин, при комнатной температуре). За единицу СОД-миметической активности принимали количество β -АМК-789, вызывающее 50% подавление обесцвечивания КБС. Удельная СОД-миметическая активность β -АМК-789 была определена в расчете на 1 мг этого соединения в 1 мл реакционной смеси (ед/мг/мл).

Мембраны митохондрий были выделены и очищены методом дифференциального центрифугирования из гомогената печени быка. После гомогенизации ткани (55г) в растворе 0,25 М сахарозы (1:40 об/об), ядра клеток осаждали центрифугированием при 3000 об/мин 10 мин, митохондрии осаждали центрифугированием полученного супернатанта при 14000 об/мин, 10 мин. После смешивания осадка митохондрий с раствором сахарозы (1:100 об/об) и центрифугирования очищенные митохондрии смешивали с водой (1:30 об/об) и замораживали. Через 10 ч митохондрии размораживали (происходил лизис митохондрий) и гомогенизировали в воде (1:50 об/об) в течение 4 мин при 4°C. Из этого гомогената мембраны митохондрий осаждали центрифугированием при 14.000 об/мин, 15 мин. После двукратного повторения процедуры промывания мембран митохондрий, последние окончательно гомогенизировали в воде (1:40 об/об). Таким образом из 55 г печеночной ткани выделяли 120 мл водной смеси мембран митохондрий, которые использовались для получения Nox.

Для определения степени рилизинга суммарной фракции изоформ Nox1 и Nox2 из мембран митохондрий и влияния на этот процесс β -АМК-789, в контрольной пробе к 10 мл водной смеси мембран митохондрий добавляли ферри-Нб, до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М, рН смеси доводили до 9,5, в опытной - к указанной смеси добавляли 0,3 мг/мл β -АМК-789 при рН 9,5. Обе пробы инкубировали в течение часа при 37°C. После центрифугирования обеих пробы (при 14.000 об/мин, 15 мин), супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на колонке (4x10 см) с целлюлозой DE-52 («Whatman» Англия). Из суммарную фракцию изоформ Nox1 и Nox2 элюировали 0,1 М калий фосфатным буфером, рН 7,4. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре “Specord UV/VIS” (Германия), с длиной оптического пробега 1 см. Обработку полученных данных проводили осуществляли методом вариационной статистики с определением значимости изменений по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что под влиянием O_2^- , образованных при расщеплении H_2O_2 отмечается снижение плотности максимального оптического поглощения КБС при 580 нм (*рис.1*).

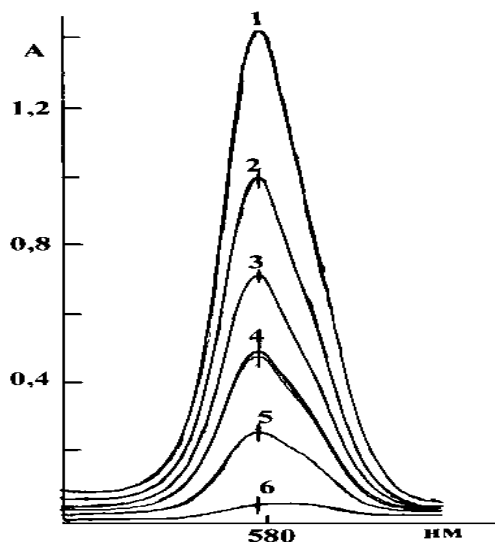


Рис.1. Снижение плотности максимального оптического поглощения КБС (по 5мл) при 580 нм, при рН 9,5, без добавления 0,1 мл O_2^- или с добавлением 0,1 мл O_2^- и $5 \cdot 10^{-8}M$ Cu,Zn-СОД или каталазы (1); с добавлением 0,1 мл O_2^- , в присутствии: 2 мг/мл (2), 1,5 мг/мл (3), 1 мг/мл (4) и 0,5 мг/мл β -АМК-789 (5) и после добавления к 5 мл КБС 0,1 мл O_2^- (6), $p < 0,02$, $n = 6$.

Известно, что путем ферментативного дисмутирования O_2^- супероксиддисмутазой или расщеплением перекиси водорода каталазой процесс продуцирования O_2^- не наблюдается (КБС не обесцвечивается). Обесцвечивание КБС супероксидными радикалами обусловлено одноэлектронным восстановлением этого красителя именно супероксидными радикалами, а не гидроксильными радикалами, которые являются наиболее сильными окислителями биосистем. При этом, улавливание HO^\bullet -радикалов спиртами или сахарами (скавенджеры HO^\bullet) приводит к резкому увеличению стационарной концентрации O_2^- и быстрому обесцвечиванию КБС. Как следует из представленных данных, β -АМК-789 концентрация-зависимо угнетает восстановление КБС при добавлении O_2^- , причем этот эффект носит линейный характер (рис.2).

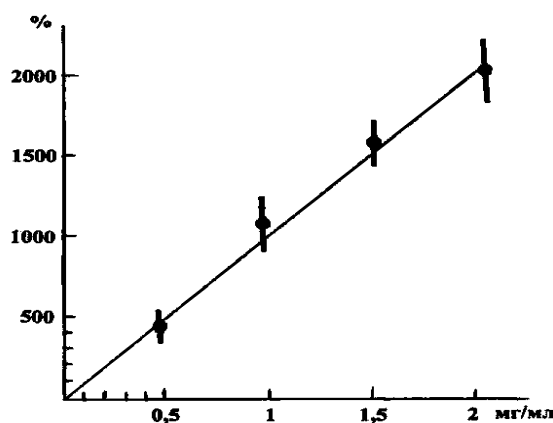


Рис.2. Проценты подавления восстановления КБС супероксидными радикалами в присутствии различных концентраций β-АМК-789.

Принимая за единицу СОД-миметической активности 50%-ное подавление β-АМК-789 процесса обесцвечивания КБС супероксидными радикалами, удельная активность β-АМК-789 определяется путем экстраполяции, что составляет $20,0 \pm 0,2$ ед/мг/мл ($p < 0,01$, $n=6$). Таким образом, установлено, образующиеся при расщепления перекиси водорода (рН 9,5) O_2^- нейтрализуются β-АМК-789 за счет наличия у нее СОД-миметической активности.

Антиоксидантная активность β-АМК-789 приобретает особую значимость, поскольку повышенная генерация активные формы кислорода участвуют в инициации процесса ПОЛ и увеличения текучести биомембран, облегчая при снижении стабильности эритроцитарных мембран, проникновение экстраэритроцитарного Нв в поверхностные слои биомембран, что послужило основанием для изучения становится влияния β-АМК-789 на процессе релизинга изоформ Nox митохондриальных мембран.

Как следует из представленных данных, β-АМК-789 в концентрации 0,3 мг/мл вызывает снижение интенсивности Нв-индуцирующего релизинга суммарной фракции изоформ Nox1 и Nox2, не влияя на оптические спектральные характеристики последних. Под действием β-АМК-789 статистически значимо на $33,6 \pm 4,4\%$ ($P < 0,03$), снижется плотность β-поглощения отщепленных изоформ Nox1 и Nox2 при 560 нм, что свидетельствует о мембраностабилизирующем эффекте исследуемого соединения. (рис.3).

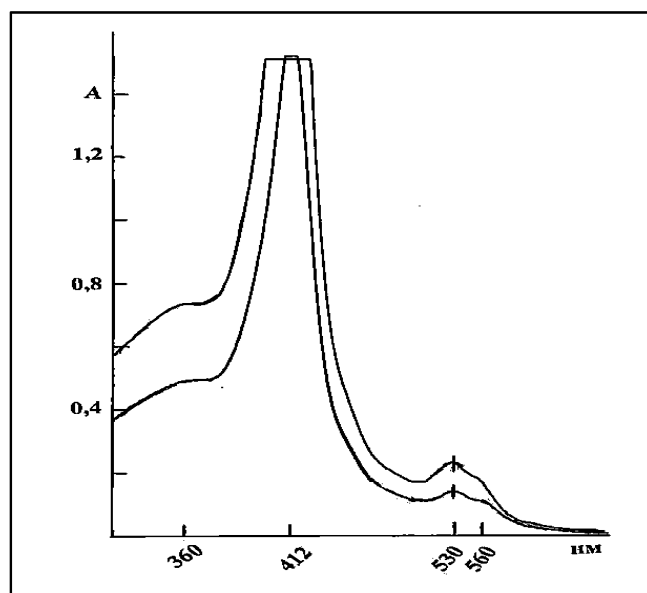


Рис.3. Оптические спектры поглощения суммарной фракции изоформ Nox (Nox1+ Nox2) выделенной из мембран митохондрий печени быка в результате гемоглобин-индуцирующего релизинга этого фермента (при pH 9,5): в отсутствии (1) и присутствии 0,3 мг/мл β -АМК-789 (2), $p < 0,05$, $n = 6$.

Реализация указанного эффекта происходит за счет подавления β -АМК-789 Hb-индуцирующего релизинга суммарной фракции изоформ Nox. Свидетельством избирательного комплексообразования Hb с локализованными в биомембранах изоформами Nox, является получение высокоочищенной суммарной фракции изоформ Nox1 и Nox2 с выделением путем гель-фильтрации электрофоретически гомогенных Nox1 и Nox2.

Таким образом установлено, что β -АМК-789, обладая антиоксидантным действием за счет наличия СОД-миметической активности, обнаруживает способность ингибировать процесс Hb-индуцирующего релизинга суммарной фракции изоформ Nox из мембран митохондрий, проявляя, тем самым, мембраностабилизирующий эффект.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сагиян А.С. Асимметрический синтез небелковых α -аминокислот // Хим. ж. Армении, 2007, №4, 60, сс.762-788.
2. Сагиян А.С., Геолчянян А.В., Манасян Л.Л. и соавт. Асимметрический синтез S-(1,2,4-триазол-3-ил)-(R)-цистеинов нуклеофильным присоединением тиотриазолов к комплексу Ni^{II} с хиральным основанием Шиффа дегидроаланина // Изв. РАН., сер. хим., 2004, №4, сс.894-897.

3. Сагиян А.С., Геолчяян А.В., Григорян А.А. и др. Асимметрический синтез (R)-S-5-(2'-метоксифенил)-4-аллил-1,2,4-триазол-3-ил-цистеина и (R)-S-5-(2'-хлорфенил)-4-аллил-1,2,4-триазол-3-ил-цистеина // Хим. ж. Армении, 2004, т.57, №1-2, сс.85-92.
4. Сагиян А.С., Манасян Л. Л., Геолчяян А. В. и соавт. Исследование реакции асимметрического присоединения гетероциклических тиолов к хиральным комплексам дегидроаминомасляной кислоты. Асимметрический синтез 2L,3L-allo-β-метил-S-5-(3'-гидроксипропил)-4-аллил-1,2,4-триазол-3-ил-цистеина // Хим. ж. Армении 2003, т. 56, №1-2, сс.64-71.
5. Симонян М.А. Способ получения супероксиддисмутазы из животного сырья. Открытия ИЗОБРЕТЕНИЯ (СССР), 1988, N28: 107, АС 1413139.
6. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А. Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
7. Солдатенков А.Т., Колядина Н.М., Шендрик И.В. Основы орг. Химии лекарственных веществ // Москва, Химия, 2001, сс.36-47.
8. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Алексанян С.С., Енгибарян А.А., Симонян М.А.. Подавление L-аргинином гемоглобин-индуцирующего рилизинга NADPH оксидазы из мембран клеток аорты сердца крыс // Вопр. Теорет. Клин. Мед., 2013, 16(8), сс.75-78.
9. Panday A, Sahoo M.K, Osorio D. and Sanjay Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies // Cellular & Molecular Immunology, 2015, 12, pp. 5–23.
10. Samir Mohamed El Rayes // Molecules, 2010, №15, pp.6759-6772.
11. Simonyan R.M., Galoyan K.A, Hachatryan A.R, Babayan M.A, Oxuzyan G.R, Simonyan M.A. Ferrihemoglobin induces the release of NADPH oxidase from brain tissue cell membrane ex vivo: the suppression of this process by galarmin // Neurochemical Journal, 2013, 7(3), pp.221-225.
12. Senthil N., Manoharan S. Lipid peroxidation and antioxidants status in patients with papillary thyroid carcinoma in India // Asia Pac J Clin Nutr. 2004,13(4), pp.391-395.
13. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Generation of superoxide radicals in alkaline solution of hydrogen peroxide and the effect of superoxide dismutase on this system // Biochim.Biophys. Acta, 1979, 583(3), pp. 279-286.