

МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ β -ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННОГО АНАЛОГА α -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА КЛЕТОЧНЫЕ И СУБКЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

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

¹Ереванский государственный университет, Институт Фармации, Армения, 0025 Ереван, ул. А. Манукяна, 1, E-mail: lusine_sahakyan@ysu.am

²Институт биохимии им.акад. Г.Х. Бунятыана НАН РА

В исследованиях, проведенных на беспородных белых крысах изучено влияние нового β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты – β -АМК-789 на ферриHb-индуцированный рилизинг суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox1+Nox2) из клеточной и субклеточных мембран (ядерные, митохондриальные), выделенных из легочной и почечной тканей и мембран эритроцитов донорской крови. Установлено, что в основе протекторного действия β -АМК-789 на исследованные клеточные и субклеточные мембраны, лежит его антиоксидантная активность с подавлением процессов липидной перекисидации и мембраностабилизирующее действие, реализуемое путем ингибирования ферриHb-зависимого рилизинга из биомембран суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы, являющейся важным функциональным компонентом мембранных структур.

ԲԶՁԱՅԻՆ ԵՎ ԵՆԹԱԲԶՁԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՎՐԱ α -ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ β -ՀԵՏԵՐՈՑԻԿԼԻԿԻ ՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ԱՇԱՆՑՅԱԼԻ ՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

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

¹Սաղյան Ա.Ս.

Սպիտակ, ոչ ցեղային առնետների վրա կատարված հետազոտություններում ուսումնասիրվել է α -ամինակարապաթթվի β -հետերոցիկլիկ տեղակալված նոր անալոգի՝ β -АМК-789, ազդեցությունը թոքային և երիկամային հյուսվածքներից առանձնացված բջջային և ենթաբջջային թաղանթներից (կորիզային, միտոքոնդրիալ) և դոնորական արյան էրիթրոցիտների թաղանթներից NADPH օքսիդազի իզոմերների (Nox1+Nox2) գումարային ֆրակցիայի ֆերիHb-ով հարուցված արտազատման (ռիլիզինգի) գործընթացի վրա: Հաստատված է, որ ուսումնասիրված բջջային և ենթաբջջային թաղանթների վրա β -АМК-789 –ի պաշտպանիչ ազդեցության հիմքում ընկած է նրա հակաօքսիդիչ ակտիվությունը՝ լիպիդային գերօքսիդացման գործընթացների արգելակմամբ, և թաղանթակայունացնող ազդեցությունը, ինչն իրականացվում է թաղանթի կառուցվածքում կարևոր ֆունկցիոնալ բաղադրիչ հանդիսացող NADPH օքսիդազի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի ֆերիHb-կախյալ արտազատման (ռիլիզինգի) արգելակման միջոցով:

MECHANISMS OF PROTECTIVE EFFECT OF β -HETEROCYCLIC SUBSTITUTED ANALOGUE OF α -AMINO BUTYRIC ACID ON CELLULAR AND SUBCELLULAR MEMBRANES

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

In research conducted on non-native white rats, the effect of a new β -heterocyclic substituted analogue of α -aminobutyric acid – β -AMK-789 on ferriHb-induced releasing of the total fraction of NADPH oxidase isoforms (Nox1 + Nox2) from cell and subcellular membranes (nuclear, mitochondrial), isolated from pulmonary and renal tissues and membranes of red blood cells of donor blood was studied. It has been established that the protective effect of β -AMK-789 on the studied cellular and subcellular membranes is based on its antioxidant activity with suppression of lipid peroxidation processes and membrane-stabilizing effect realized by inhibiting ferriHb-dependent releasing of the total fraction of NADPH oxidase isoforms from biomembranes, which is an important functional component of membrane structures.

Введение. Причиной повышенного интереса к небелковым β -гетероциклически замещенным α -аминокислотам, которые являются чужеродными как по структуре, так и по природе гетероатомов, является то обстоятельство, что последние и, особенно, соединения на основе 1,2,4-триазолов проявляют полиморфную биологическую активность [3,4]. Так, установлено, что β -гетероциклически замещенный аналог 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 -AMK-789) обнаруживает концентрация-зависимое антиоксидантное действие за счет наличия СОД-миметической активности. Выявлено, что β -AMK-789 значительно снижает интенсивность Нб-индуцирующего релизинга суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы, что свидетельствует о наличии у β -AMK-789 мембраностабилизирующего действия [2].

Выбор NADPH оксидазы в качестве одного из показателей характеризующих функциональное состояние биомембран был продиктован тем, что изоформы NADPH оксидазы, будучи локализованы в клеточных и субклеточных мембранах, продуцируя супероксидные радикалы (O_2^-), принимают участие в механизмах митохондриального дыхания, кислородного гомеостаза, пролиферации, апоптоза и экспрессии генов [11]. Существенно, что являясь структурно-функциональным компонентом биомембран, изоформы NADPH оксидазы под влиянием гемоглобина подвергается отщеплению (*релизингу*) [8] с развитием мембранных расстройств, в связи с чем, изыскание новых биоактивных соединений, ингибирующих релизинг Nox из биомембран, является одной из приоритетных проблем современной биомедицины. С открытием явления нестабильного

комплексообразования между гемоглобином и изоформами Nox важным шагом в этом направлении явилась разработка сравнительно щадящего метода выделения и очистки изоформ Nox без применения детергентов [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты (β -АМК-789) на ферриHb-индуцированный рилизинг суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox1+Nox2) из клеточной, субклеточных (*ядерные, митохондриальные*) и эритроцитарных мембран.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 150-170г., содержащихся в обычных условиях вивария. В исследовании использован комплекс методических подходов по выделению и изучению биомембран.

Выделение и очистка клеточных и субклеточных мембран. После гомогенизации легочной и почечной тканей (по 30 г) с 0,25 М сахарозой (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. Из полученных супернатантов клеточные мембраны осаждали центрифугированием при 6000 об/мин 10 мин, pH5,6. После смешивания осадка митохондрий и ядер с раствором сахарозы (1:100 об/об) и центрифугирования в аналогичных условиях очищенные митохондрии и ядра смешивали с водой (1:30 об/об) и замораживали, после чего, через 20 ч с целью лизиса митохондрий и ядер размораживали и гомогенизировали в воде (1:50 об/об) в течение 2 мин при 4°C. Из гомогенатов клеточные, митохондриальные и ядерные мембраны осаждали центрифугированием при 14.000 об/мин, 10 мин. После двукратного повторения процедуры промывания мембран их окончательно гомогенизировали в воде (1:40 об/об). В результате из 30 г ткани легких и почек белых половозрелых крыс выделяли по 95 мл водной смеси мембран клеток, митохондрий и ядер, которые использовались для ферриHb-индуцированного отщепления из них суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox1+Nox2) [5].

Выделение и очистка эритроцитарных мембран. Стабилизированную гепарином, оксалатом или цитратом натрия донорскую кровь (12 мл) центрифугировали при 6000 об/мин, 8 мин. После чего полученный осадок смешивали с физиологическим раствором (1:100 об/об) и центрифугировали при 1000 об/мин, 5 мин. Осажденные эритроциты промывали физиологическим раствором (1:100 об/об) и центрифугировали. После двукратного

промывания эритроциты подвергали гемолизу путем смешивания с водой (1:50 об/об). Эритроцитарные мембраны осаждали центрифугированием при рН5,6 в течение 10 мин. Далее осадок эритроцитарных мембран (ЭМ) гомогенизировали 0,04 М калий фосфатным буфером, рН7,4 (1:1000 об/об). Указанную процедуру повторяли 2-3 раза, до получения бесцветного супернатанта. Очищенные ЭМ окончательно гомогенизировали в 100 мл воде [6].

Определение степени ферриНб-индуцированного рилизинга суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы из биомембран. В контрольной группе к водной смеси (по 10 мл) клеточных и субклеточных (*митохондриальные, ядерные*) мембран, полученных из легочной и почечной тканей и эритроцитарных мембран, добавляли ферриНб из эритроцитов человека, до концентрации 50мкМ, рН смеси доводили до 9,5, с добавлением 0,05 М КОН.

В опытной группе к указанной смеси добавляли β -АМК-789 (0,3 мг/мл при рН 9,5). После инкубирования проб в течение часа при 37°C и их последующего центрифугирования (14.000 об/мин, 15 мин,) супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52 («Whatman»). Из колонки суммарную фракцию изоформ NADPH оксидазы элюировали 0,1 М калий фосфатным буфером, рН7,4 [5].

Использованный метод выделения суммарной фракция изоформ NADPH оксидазы являются более щадящим, поскольку при общепринятом иммуноэлектрофоретическом методе Vestern-Blotting используемые перекись водорода, детергент и ультразвук вызывают частичную необратимую денатурацию изоформ NADPH оксидазы [1].

Определение оптических спектральных показателей суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы. Суммарную фракцию изоформ Nox1+Nox2 инкубировали с β -АМК-789 в течение часа при 37°C *in vitro*. Далее регистрировали оптические спектры поглощения изоформ Nox1+Nox2 из биомембран в окисленном и восстановленном дитионитом натрия состояниях. NADPH зависимую O_2^- -продуцирующую активность суммарной фракции изоформ Nox определяли нитротетразолиежым синим (НТС) методом [7]. Оптические спектры поглощения были зарегистрированы на спектрофотометре «Hitachi-2000», с длиной оптического пробега 1 см. Статистическую значимость различий полученных результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что характерная форма оптических спектров поглощения в видимой части спектра суммарной

фракции изоформ NADPH оксидазы (Nox1+Nox2) из клеточных субклеточных (митохондриальные, ядерные) и эритроцитарных мембран в окисленном и восстановленном состояниях после их инкубации при 37°C при pH9,5 в течение часа с β -АМК-789 (0,3 мг/мл) не подвергается изменениям (рис.1).

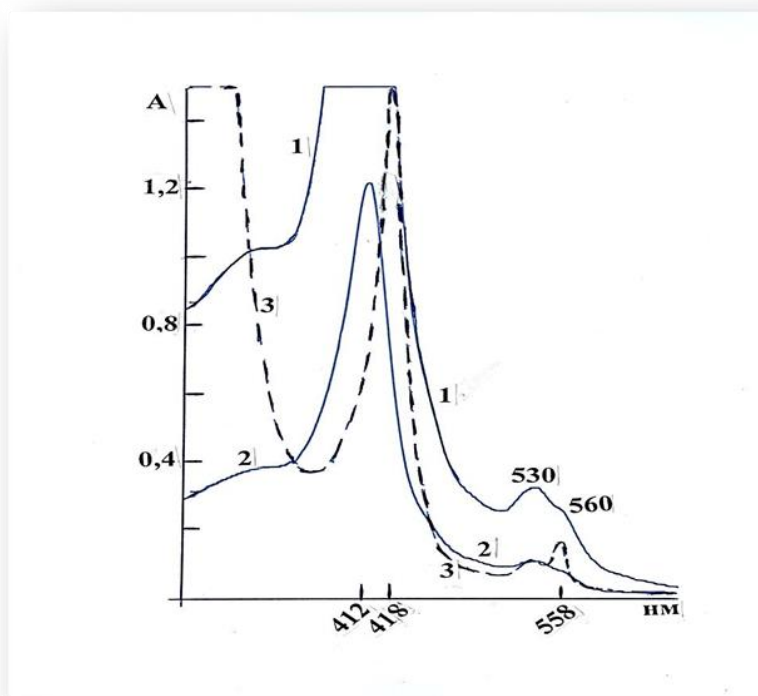


Рис.1. Характерная форма оптических спектров поглощения в видимой области спектра суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы из клеточных мембран, мембран ядер и митохондрий клеток печени и почек подопытных крыс и мембран эритроцитов донорской крови после их инкубации с β -АМК-789 в окисленном состоянии (1,2) и после восстановления (2)-ого дитионитом натрия (3).

Однако, обращает на себя внимание, что под влиянием β -АМК-789 (0,3 мг/мл) содержание O_2^- , продуцируемых изоформами суммарной фракции NADPH оксидазы, снижается в среднем на 15-18%. Одновременно установлено, что β -АМК-789 обнаруживает способность в различной степени подавлять ферриНв-индуцированное избирательное отщепление фракции изоформ NADPH оксидазы из исследуемых клеточных и субклеточных мембран (табл., рис.2).

Таблица.. Влияние β -АМК-789 на релизинг суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы из клеточных и субклеточных мембран.
Плотность максимального оптического поглощения (β -поглощение при 530 нм)

Группы	Мембраны выделенные из легочной ткани		
	Клеточные мембраны	Ядерные мембраны	Митохондриальные мембраны
Контрольная	0,33±0,006	0,41±0,009	0,26±0,008
Опытная: <i>β</i> -АМК-789	0,21±0,008 <i>P</i> <0,001 -36,4%	0,28±0,003 <i>P</i> <0,001 -31,7%	0,18±0,005 <i>P</i> <0,05 -30,8%
	Мембраны выделенные из почечной ткани		
	Клеточные мембраны	Ядерные мембраны	Митохондриальные мембраны
Контрольная	0,24±0,006	0,31±0,008	0,21±0,008
Опытная: <i>β</i> -АМК-789	0,18±0,006 <i>P</i> <0,001 -25,0%	0,23±0,005 <i>P</i> <0,001 -25,8%	0,18±0,008 <i>P</i> <0,05 -14,3%

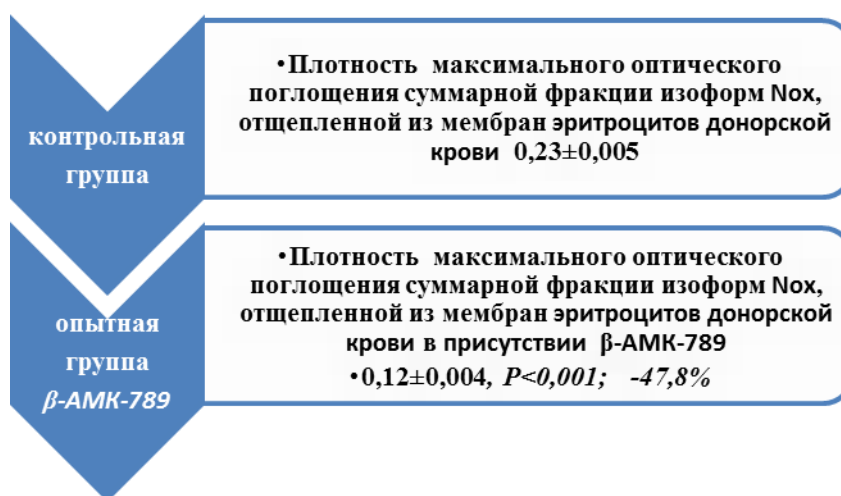


Рис.2 Влияние *β*-АМК-789 на рилизинг суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы из эритроцитарных мембран.

Анализируя полученные данные, свидетельствующие о действии *β*-гетероциклически замещенного аналога *α*-аминомасляной кислоты – *β*-АМК-789 на функциональное состояние клеточных и субклеточных мембран имеются основания считать, что в основе реализации протекторного действия *β*-АМК-789 на биомембраны лежит его антиоксидантная активность. Согласно современным представлениям угнетение процессов перекисного окисления липидов сопровождается снижением текучести биомембран и ограничением внедрения ферриНв в их поверхностные слои, с образованием нестабильного комплекса с локализованными в мембранных структурах изоформами NADPH оксидазы [13].

Существенно, что β -АМК-789 практически не влияет на оптические спектральные показатели в видимой области спектра изоформ NADPH оксидазы, выделенных из исследованных биомембран, нейтрализуя продуцируемыми изоформами Nox1+Nox2 супероксидные радикалы. Обращает на себя внимание, что β -АМК-789 обнаруживает способность ингибировать процесс ферриНв-зависимого отщепления изоформ Nox1+Nox2 из клеточных, митохондриальных и ядерных мембран выделенных из легочной и почечной тканей, как и эритроцитарных мембран, что в целом свидетельствует о наличии у исследуемого β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты универсального мембранопротекторного свойства. Полученные данные приобретают особую значимость, поскольку следует считать установленным, что снижение уровня изоформ NADPH-оксидазы в биомембранах, реализуемое путем их отщепления гемоглобином, сопровождается нарушением мембранных функций за счет повреждающего действия внеэритроцитарного гемоглобина на мембранные структуры. Одновременно выявлено, что процесс отщепления изоформ NADPH-оксидазы обратно пропорционален уровню антирадикального потенциала. В этой связи следует особо отметить, что в отличие от ключевого фермента антиоксидантной активности – Cu,Zn-СОД, которая дезактивируется избыточно генерируемыми НО-радикалами [12], β -АМК-789 наоборот ингибирует процессы свободнорадикального окисления в мембранных образованиях. Таким образом, установлено, что в основе протекторного действия вновь синтезированного β -гетероциклически замещенного аналога α -аминокислоты – β -АМК-789 на клеточные и субклеточные мембраны, лежит его антиоксидантная активность с подавлением процессов липидной пероксидации и мембраностабилизирующее действие, реализуемое путем ингибирования ферриНв-зависимого рилизинга из биомембран суммарной фракции изоформ NADPH оксидазы, являющихся важным функциональным компонентом мембранных структур [9].

Результаты проведенного исследования, являясь свидетельством перспективности проведения научных изысканий в области синтеза и изучения различных проявлений биологической активности небелковых β -гетероциклически замещенных α -аминокислот, одновременно диктуют необходимость проведения дальнейших исследований эффективности β -АМК-789 как потенциального лекарственного средства мембранопротекторного действия, особенно с учетом, что в патогенезе ряда сердечно-сосудистых заболеваний определенная роль придается повышению O_2^- -продуцирующей активности изоформ NADPH оксидазы [10,14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелконян Л.Г. Симонян Р.М., Секоян Э.С., Симонян М.А. Изменение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности цитохрома b_{558} из мембран клеток селезенки и эритроцитов, индуцированные излучением различной природы. ДНАН РА, 2009, 109(3). С.225-235.
2. Саакян Л.Ю., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Антиоксидантная активность и механизмы мембраностабилизирующего действия нового β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты. //Вопр. теоретической и клинической медицины 2017, 20(2). С.64-67.
3. Сагян А.С., Манасян Л. Л, Геолчанян А. В. Дадаян С.А. 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. журнал. Армении 2003, т. 56, №1-2, С.64-71.
4. Сагян А.С., Геолчанян 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, С.894-897.
5. 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.
6. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. N 908 Армпатента, Ереван, 2001.
7. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. ФАД и углеводные остатки в составе ЭМ цитохрома b_{558} , его NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность и ЭПР спектральные характеристики. //Мед. наука. Армении, 2003, XLIII(1). С.30-34.
8. Фесчан С.М. Стимуляция ферригемоглобином рилизинга изоформ NADPH-оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесса α -токоферолом и L-аргинином *ex vivo*. //Медицина, наука и образование, 2013. №14. С.96-102.
9. Bedard K., Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. //Physiological Reviews. 2007. Vol.87(1). P.245-313.
10. Borch E., Bargelli V., Stillitano F. et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. //Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol.1802(3). P.331-338.
11. Chuong Nguyen M.V., Lardy B. et al. NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family. //Med. Sci. (Paris). 2015. Vol.31. P.43-52.
12. Ramasarma T. Emergence of oxy radicals as selective oxidants.// Indian J. Biochem. Biophys., 2012. Vol.49. P.295-305.
13. Yin H., Xu L., Porter N.A.. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. Review. *Chem. Rev.*, 2011, Vol.111(10) P.5944–5972.
14. Zalba G., r Beloqui O., San José G. et al. NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production Is Associated With Carotid Intima-Media Thickness in Subjects Free of Clinical Atherosclerotic Disease. //Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biologi, 2005, Vol.25. P.1452-1457.