

ВЛИЯНИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩЕГО ПРОИЗВОДНОГО 3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛПИРОКАТЕХИНА (СОЕДИНЕНИЕ BS-08) НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

И.Н. Медведский

Белорусский государственный медицинский университет

Дифенольные соединения обладают выраженными антиоксидантными, антигипоксическими, нейрозащитными и антиканцерогенными свойствами [3]. Защитную активность производных пирокатехина (1,2-дифенолы) и гидрохинона (1,4-дифенолы) связывают со способностью этих соединений окисляться в соответствующие хиноны и активировать фактор антиоксидантной защиты Nrf2 [7,8,10]. Альтернативный механизм защитного действия дифенолов заключается в повышении стабильности и ингибировании деградации Nrf2 в 26S протеосомах [6]. **Перечень Nrf2-зависимых генов включает гены, отвечающие за экспрессию ферментов II фазы метаболизма ксенобиотиков (глутатион S-трансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы), транспортных белков (MDR и ABC переносчики), ферментов глутатионового обмена (глутатионредуктаза, глутамат-цистеин лигаза), белков, участвующих в обмене железа, липидов, углеводов (ферритин, гемоксигеназа, липопротеинлипаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), антиоксидантов (пероксиредоксин, тиоредоксин), факторов транскрипции (ретиноидный X рецептор) [4,9].**

Серосодержащее вещество 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутил-пирокатехин (соединение BS-08) является представителем класса пространственно экранированных производных пирокатехина [2]. Наличие в структуре 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутил-пирокатехина гидроксильных групп в орто-положении друг к другу позволяет рассматривать данное соединение как потенциальный активатор фактора транскрипции Nrf2.

Цель работы — оценить влияние 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутил-пирокатехина на активность ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов и печени мышей.

Материал и методы.

Реагенты и субстанции. 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутил-пирокатехин (соединение BS-08) был предоставлен кафедрой радиационной химии и химико-фармацевтических технологий Белорусского государственного университета. Для проведения биохимических исследований использовались реагенты фирм “AppliChem”, “Fluka” и “Sigma-Aldrich” (Германия).

Схема эксперимента. Изучение антиоксидантных свойств соединения BS-08 проводили на белых рандомбредных мышах-самках массой 23–25 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животные были рандомно распределены в 4 экспериментальные группы по 6 животных в каждой. Соединение BS-08 вводили внутрижелудочно ежедневно в течение 4 дней в дозах 20, 50 и 126 мг/кг. Контрольная группа животных получала внутрижелудочно растворитель (1% крахмальный гель с эмульгатором Твин 80). На 5-е сут. у животных под наркозом диэтиловым эфиром

забирали кровь из правого желудочка сердца. После забора крови животных подвергали цервикальной дислокации, а затем извлекали печень. Кровь с ЭДТА в качестве антикоагулянта (1мг/мл) центрифугировали 7 мин с ускорением 1000×g, плазма удалялась, а эритроцитарная масса дважды отмывалась в холодном физрастворе. Эритроциты гемолизировали дистиллированной водой в соотношении 1/10. Печень промывали от эритроцитов в холодном 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4), а затем измельчали в стеклянном гомогенизаторе с фосфатным буфером в соотношении 1/5.

Антиоксидантное действие соединения BS-08 оценивали по концентрации не связанных с белками тиолов (тиолы), активности глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТр). В гомогенатах печени оценивали активность глутатионредуктазы и глутатион S-трансферазы. Параметры антиоксидантного статуса определяли фотометрическим методом на фотометре Solar PM2111 по методикам, описанным ранее [1, 3, 5].

Статистическая обработка данных проводилась в ППП «SPSS17». Данные представлены в таблице в виде среднего значения и границ 95% доверительного интервала (ДИ). Для анализа связи между параметрами использовался коэффициент линейной корреляции Пирсона. Наличие зависимости доза-эффект оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием линейных контрастов. Отличия считали статистически значимыми при вероятности ошибки 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Внутривенное введение соединения BS-08 мышам в течение 4 дней приводило к статистически значимому снижению концентрации тиолов приблизительно на 10% в дозах 50 и 126 мг/кг (табл.). Линейный тренд к уменьшению концентрации тиолов может быть обусловлен реакциями, протекающими по гидроксигруппам пирокатехина либо по серосодержащему радикалу. Так, окисление соединения BS-08 пероксидами приводит к образованию сульфоксидов, которые способны восстанавливаться в сульфиды с затратой 2 молекул тиолов [11]. Другой возможный механизм снижения концентрации тиолов включает образование АФК в ходе реакций окислительно-восстановительного цикла, в которых происходит окисление 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутил-пирокатехина до соответствующего семихинона и хинона, а затем регенерация исходного соединения.

Дозозависимое снижение концентрации тиолов сопровождалось увеличением активности глутатионредуктазы эритроцитов в дозах 50 и 126 мг/кг. Кратность повышения активности фермента составила 1,69 и 1,78 раз соответственно. Наличие связи между понижением концентрации тиолов и повышением активности глутатионредуктазы ($r = -0,53$), по всей вероятности, свидетельствует о регуляции активности данного фермента за счет изменения концентрации восстановленного глутатиона, который поддерживает фермент в неактивном состоянии [12]. В настоящем эксперименте индукция является маловероятным механизмом повышения активности глутатионредуктазы в крови по причине малой длительности эксперимента, недостаточной для обновления эритроцитов, безъядерных клеток.

Таблица

Влияние соединения BS-08 на показатели антиоксидантной защиты эритроцитов и печени

Параметры	Контроль N=6	20 мг/кг N=6	50 мг/кг N=6	126 мг/кг N=6
Тиолы (мкмоль/г Hb)	9,09 (8,25; 9,93)	8,68 (8,2; 9,16)	8,13* (7,16; 9,09)	8,16* (7,62; 8,71)
ГР (мкмоль/мин/г Hb)	2,49 (1,57; 3,42)	3,41 (2,44; 4,39)	4,20* (3,36; 5,04)	4,43* (3,81; 5,05)
ГТр (мкмоль/мин/г Hb)	3,31 (2,34; 4,29)	3,58 (2,85; 4,30)	3,29 (3,01; 3,57)	3,27 (1,86; 4,69)
ГР печени (нмоль/мин/ мг белка)	107 (72; 142)	112 (91; 134)	119 (101; 136)	143* (121; 165)
ГТр печени (нмоль/мин/ мг белка)	940 (741; 1139)	1004 (775; 1232)	1083 (934; 1231)	1674* (1315; 2033)

* $p < 0,05$ (ANOVA с линейными контрастами)

В дозе 126 мг/кг происходило повышение активностей глутатионредуктазы и глутатион S-трансферазы печени. Кратность повышения активности составила 1,34 и 1,78 раз соответственно. Рост активности

глутатион S-трансферазы в гомогенатах печени может объясняться механизмом индукции — результат активации фактора Nrf2. В пользу гипотезы о регуляции активности фермента на уровне транскрипции может свидетельствовать отсутствие изменений в безядерных эритроцитах. Более высокий дозовый порог для активации ферментов печени по сравнению с эритроцитами может объясняться отличиями в содержании свободных тиолов и конститутивной активности ферментов, участвующих в восстановлении хинонов.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об умеренном активирующем влиянии соединения BS-08 на активность Nrf2-зависимых ферментов антиоксидантной защиты (глутатион S-трансфераза и глутатионредуктаза) в эритроцитах и гомогенатах печени и требуют дополнительного изучения.

THE INFLUENCE OF SULFUR-SUBSTITUTED DERIVATIVE OF 3,5-DI-TERT-BUTYLCAECHEOL (COMPOUND BS-08) ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN ERYTHROCYTES AND LIVER OF MICE

I.N. Medvedsky

Sulfur-substituted derivative of 3,5-di-tert-butylcatechol (compound BS-08) was found to be an activator of Nrf-dependent enzymes involved in glutathione exchange and metabolism of xenobiotics (glutathione reductase and glutathione S-transferase). Practical significance of obtained results should be scientifically verified using distinct models of pathology.

Литература.

1. Власова С. Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Перслегина // *Лабораторное дело*. 1990. Т. , № 8. С.19 – 21.
2. Петрекевич, Д. К. Синтез и противовирусная активность некоторых производных 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина / Д. К. Петрекевич, В. А Тимошук, О. И. Шадыро и др. // *Химико-фармацевтический журнал*. 1995. Т. 29, № 12. С. 32 – 34.
3. Юсупова, Л. Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов / Л. Б. Юсупова // *Лабораторное дело*. 1989. Т. , № 4. С. 19 – 21.
4. Copple, I. M. The Keap1–Nrf2 cell defense pathway—a promising therapeutic target? / I. M. Copple // *Advances in Pharmacology*. 2012. Vol. 63. P. 43–79.
5. Miwa, S. Recommended methods for an additional red cell enzyme (pyrimidine 5'-nucleotidase) assay and the determination of red cell adenosine-5'- triphosphate, 2,3-diphosphoglycerat and reduced glutathione / S. Miwa, L. Luzzatto, R. Rosa et al. // *Clinical & Laboratory Haematology*. 1989. Vol. 11, №2. P. 131 – 138.
6. Nguyen, T. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26S proteasome / T. P. Nguyen, J. Sherratt, H. C. Huang et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 7. P. 4536–4541.
7. Prochaska, H. J. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: A unifying proposal / H. J. Prochaska, M. J. De Long, P. Talalay // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. Vol. 82, P. 8232-8236.
8. Rushmore, T. H. The Antioxidant Responsive Element / T. H. Rushmore, M. R. Morton, C. B. Pickett // *The Journal of Biological Chemistry*. 1991. Vol. 266, № 18. P. 11632 – 11639.
9. Suzuki, T. Toward clinical application of the Keap1–Nrf2 pathway / T. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013. Vol. 34, №. 6. P. 340 – 346.
10. Talalay, P. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis / P. Talalay, M. J. De Long, H. J. Prochaska // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1988. Vol. 85. P. 8261 – 8265.
11. Wallace, T. J. Reactions of thiols with sulfoxides. I. Scope of the reaction and synthetic applications / T. J. Wallace // *Journal of the American Chemical Society*. 1963. Vol. 86, № 10. P. 2018–2021.
12. Worthington, D. J. Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties / D. J. Worthington, M. A. Rosemeyer // *European Journal of Biochemistry*. 1975. Vol. 60, № 2. P. 459 – 466.