

УДК 577.152.1

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОЛОВ НА ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ МИКРОСОМ

И.А. Щепеткин¹, Р.Р. Ахмеджанов², В.Т. Кагия³

¹ Институт онкологии Томского научного центра СО РАМН, 634001, Томск, пер. Кооперативный, 5; тел. (382-2) 51-25-29; факс (382-2) 51-40-97; эл. почта: oncology@info.tsu.ru

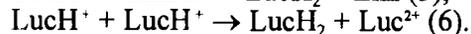
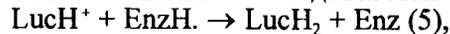
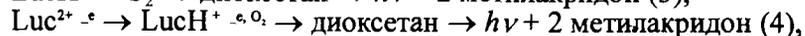
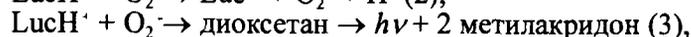
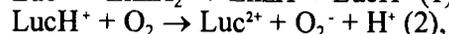
² Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск

³ Инвестиционный центр Кинки, 606, Киото, Япония

Метронидазол и аминотриазол увеличивали, а саназол (препарат АК-2123) подавлял NADPH/люцигенин-зависимую хемилюминесценцию микросом печени обработанных фенобарбиталом крыс. Саназол сильно ингибировал люцигенин-зависимую хемилюминесценцию в ферментативной системе ксантин-ксантинооксидаза. Ингибирующее действие аминотриазола и метронидазола на хемилюминесценцию в этой системе было значительно меньшее. Все эти производные азолов не поглощали свет в области испускания света люцигенином. Как люцигенин, так и саназол увеличивали, а метронидазол и аминотриазол не влияли на скорость восстановления цитохрома с микросомами при использовании в качестве донора электронов NADPH. Ингибирующее действие саназола на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию может быть связано с конкуренцией саназола (в отношении люцигенина) за электроны в активном центре флавиновых редуктаз. Таким образом, NAD(P)H-редуктазы микросом, по-видимому, могут участвовать в процессе биоактивации саназола. NAD(P)H/люцигенин-зависимая хемилюминесценция микросом не может применяться для измерения модулирующего действия агентов на продукцию активных форм кислорода микросомами, но может быть использована для люминометрического изучения ферментативного комплекса NAD(P)H-редуктазы/цитохром P450 в модельных системах.

Ключевые слова: микросомы, люцигенин, хемилюминесценция, нитроазолы, аминотриазол, цитохром P450.

ВВЕДЕНИЕ. Исследование механизма хемилюминесценции люцигенина (Luc²⁺) в биологических системах показывает, что испускание квантов света может быть следствием протекания следующих реакций [1-3]:



Реакции (1-3) протекают в аэробных условиях восстановления люцигенина такими ферментами (EnzH₂), как ксантинооксидаза, NO-синтаза, липоамиддегидрогеназа, глюкозооксидаза, альдегидоксидаза, цитохром P450-редуктаза и цитохром b₅-редуктаза [1-3]. Комплекс реакций (4), по-видимому,

ПРОИЗВОДНЫЕ АЗОЛА И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МИКРОСОМ

протекает на двухкомпонентной микросомной системе, состоящей из флавопротеина (NADPH- или NADH-зависимая редуктаза) и цитохрома P450. При избытке субстрата (Luc^{2+}) и нарушении сопряжения циклов окисления и восстановления на компонентах цитохрома P450 значительная доля интегральной хемилюминесценции обусловлена реакцией (1), в которой в роли люцигенинредуктаз выступают NAD(P)H-редуктазы микросом [1]. В условиях гипоксии может наблюдаться двухэлектронное ферментативное или неферментативное восстановление люцигенина (реакции 5 и 6), снижающее удельную интегральную хемилюминесценцию (в расчете на долю доноров электронов NADPH или NADH). Образование радикалов супероксидного аниона (O_2^-) в ходе реакции (2) не позволяет использовать люцигенин для определения уровня базальной продукции O_2^- микросомами и другими биологическими системами, содержащих ферменты с люцигенин-редуктазной активностью [1-4]. В то же время, люцигенин, по-видимому, может быть использован для оценки активности микросомных NAD(P)H-оксидоредуктаз [5]. Очевидно, что агенты с различными электронно-акцепторными свойствами и/или сродством к компонентам цитохрома P450 могут значительно изменять активность образования диоксетана и, тем самым, модулировать общий выход эмиссии света.

Влияние различных фармакологических агентов на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию микросом изучалось ранее в нескольких работах [6-8]. Результаты исследований оценивались авторами с позиции, что метод адекватно отражает базальную продукцию активных форм кислорода в микросомах и поэтому обсуждение этих данных должно быть пересмотрено исходя из приведенной выше схемы реакций (1-6). В настоящей работе сделана попытка оценить модулирующее влияние производных азолов на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию микросом как результат влияния этих агентов на активность двухкомпонентной ферментативной системы NAD(P)H-редуктаза/цитохром P450. В качестве производных азолов исследовали нитросоединения, метронидазол и саназол, а также аминотриазол, не содержащий нитрогруппы, но имеющий в своем составе как и саназол триазольное кольцо. Метронидазол (1- β -гидроксиэтил-2-метил-5-нитроимидазол) применяется в клинике в качестве противомикробного препарата, а также используется в онкологической практике как гипоксический радиосенсибилизатор [9]. Саназол (препарат АК-2123; N-(2'-метоксиэтил)-2-[3'-нитро-1"-триазолил]ацетамид) был разработан для сенсibilизации опухолевых клеток к лучевой терапии [10]; в последнее время у препарата выявлены противоопухолевые, антимастизирующие и иммуномодулирующие свойства [11-14]. Аминотриазол (амитрол; 3-амино-1H-1,2,4-триазол) в экспериментальных исследованиях используется обычно в качестве ингибитора каталазы [15].

МЕТОДИКА. В работе использовали ксантиноксидазу из коровьего молока, цитохром c из сердца лошади, супероксиддисмутазу (СОД) и соли для буферного раствора фирмы "Sigma" (США); люцигенин (2-N-метилакридина нитрат), NADPH, ксантин, аминотриазол и глицерин фирмы "Serva" (Германия); азид натрия (NaN_3) и фенобарбитал натрия фирмы "Merck" (Германия); NADH фирмы "Reanal" (Венгрия); субстанция метронидазола фирмы "Polpharma" (Польша). Саназол был предоставлен Инвестиционным центром Кинки (Киото, Япония). Натрий-фосфатный буфер (0,1 М, pH 7,4) готовился на бидистиллированной воде. Маточный раствор ксантина (5,6 мг/мл) был приготовлен на 0,1 м растворе NaOH, все остальные растворы готовились на буфере.

В эксперименте были использованы беспородные белые крысы (самцы, 180-230 г). Для повышения в микросомах активности цитохрома P450 (2B) животным внутрибрюшинно вводили фенобарбитал натрия в виде 10%-ного водного раствора в дозе 80 мг на 1 кг массы, по три инъекции с 24-часовым интервалом; через 24 ч после последней инъекции животные были декапитированы. Выделение микросом из гомогената перфузированной печени выполнено методом дифференциального центрифугирования: гомогенат центрифугировали 30 мин при

9000 g, а затем супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге L8-70M ("Beckman", США) при 105 000 g в течение 1 ч при +4°C. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере с 20% глицерина, разливали по аликвотам и хранили при -50°C до использования (не более 2 мес). Непосредственно перед экспериментом микросомы разводили в буфере до концентрации микросомного белка 4,4 мг на 1 мл и хранили на протяжении исследования не более 3-х ч при температуре +4°C.

Концентрацию белка микросом определяли биуретовым методом.

Хемиллюминетрические исследования проводили на люминометре 1251 ("LKB", Швеция), работающем в автоматическом режиме. Для стандартного измерения в люминетрическую кювету вносили 650 мкл буфера, 100 мкл раствора одного из производных азота (или 100 мкл буфера в контрольную кювету), 50 мкл суспензии микросом (до конечной концентрации микросомного белка 220 мкг/мл) и 100 мкл раствора люцигенина (до конечной концентрации 60 мкМ). После запуска циклической программы измерения в кювету через шланг добавляли 100 мкл раствора NADH или NADPH. Измерения проводили при 25°C при непрерывном перемешивании. Результаты оценивали по интегральным (за 20 мин) значениям хемиллюминесценции.

Спектрофотометрические измерения выполнялись на приборе Specord M40 ("Carl Zeiss", Германия) при температуре 25°C. Концентрацию восстановленного цитохрома *c* определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{550} = 1,85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

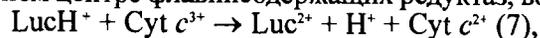
Каждое воздействие исследовалось не менее чем в трех отдельных опытах. При построении графиков использовались усредненные величины, определенные из трех измерений. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Добавление саназола к микросомам вызывало значительное подавление хемиллюминесценции как при использовании в качестве донора электронов NADPH, так и NADH. После предварительного продувания суспензии микросом CO ингибирующее действие саназола проявлялось в меньшей степени. При концентрациях саназола более 1 мМ в присутствии NaN_3 (10 мМ) или СОД (20 Ед/мл) хемиллюминесценция подавлялась практически полностью. В отличие от саназола, метронидазол и аминотриазол вызывали увеличение световой эмиссии, если в качестве донора электронов использовался NADPH ($p > 0,05$), и практически не влияли на этот процесс, если применялся NADH ($p > 0,05$) (рис. 1).

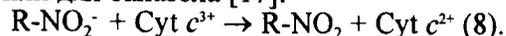
Саназол также сильно подавлял хемиллюминесценцию в ферментативной системе генерации O_2^- ксантин-ксантинооксидаза. Ингибирующее действие метронидазола и аминотриазола на хемиллюминесценцию в этой системе было выражено в значительно меньшей степени (рис. 2). Этот результат в отношении метронидазола согласуется с данными других исследователей [16].

Следует отметить, что саназол, метронидазол и аминотриазол не поглощают свет в области световой эмиссии люцигенина (результат не показан).

Как люцигенин, так и саназол увеличивали скорость восстановления цитохрома *c* в ферментативной системе ксантин-ксантинооксидаза [17], а также микросомами при использовании в качестве донора электронов NADPH (рис. 3). Метронидазол в этих системах практически не влияет на скорость восстановления цитохрома *c* ($p > 0,05$). Причина, очевидно, состоит в более высокой способности люцигенина и саназола, в отличие от метронидазола, акцептировать электроны в активном центре флавиносодержащих редуктаз, восстанавливая затем цитохром *c* [2]:



или для саназола [17]:



Таким образом, ингибирующее действие саназола на хемиллюминесценцию люцигенина сопоставимо в двух системах NAD(P)H-редуктаза/цитохром P450 и ксантин-ксантинооксидаза и может быть связано с конкуренцией саназола (в отношении люцигенина) за электроны в активном центре флавиносодержащих

ПРОИЗВОДНЫЕ АЗОЛА И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МИКРОСОМ

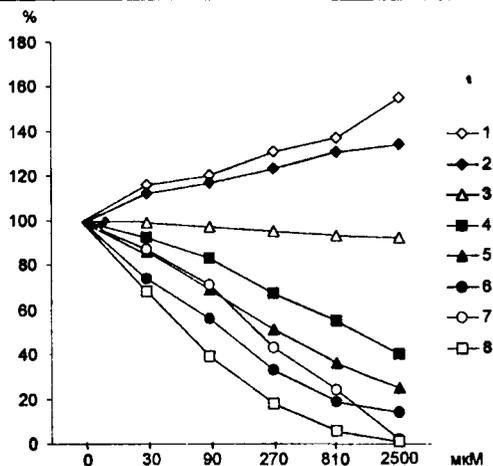


Рисунок 1.

Влияние производных азолов на люцифенин-зависимую хемилюминесценцию микросом в присутствии 25 мкМ NADPH (1,2,5-8) или 250 мкМ NADH (3 и 4). Реакционная смесь содержала указанные концентрации аминотриазола (1), метронидазола (2 и 3), саназола (4 и 5), саназола и NaN_3 (10 мМ) (7), саназола и СОД (20 Ед/мл) (8); (6) - перед добавлением саназола микросомы были обработаны продуванием суспензии СО в течение 1 мин (в присутствии NADPH). По оси ординат - % от контроля (100%) (микросомы без производных азолов, NaN_3 , СОД или предобработки СО); по оси абсцисс - концентрация азола.

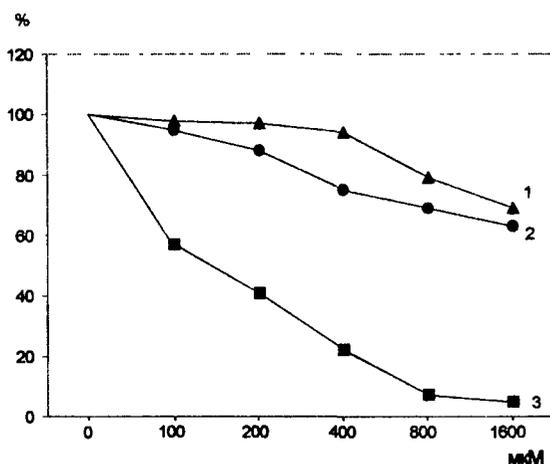


Рисунок 2.

Влияние производных азолов на люцифенин-зависимую хемилюминесценцию в ферментативной системе ксантин-ксантинооксидаза. Реакционная смесь содержала 100 мкМ ксантина и 20 мЕд/мл ксантинооксидазы, а также один из производных азолов: аминотриазол (1), метронидазол (2) или саназол (3). По оси ординат - % от контроля (без производных азолов); по оси абсцисс - концентрация азола.

редуктаз. С другой стороны, средство метронидазола и аминотриазола к гемсодержащей оксидазной области цитохрома Р450 [18, 19] может обуславливать активирующее действие этих агентов на хемилюминесценцию, возможно в результате ускорения диссоциации цитохрома Р450 и диоксетана и снижения, тем самым, безызлучательного переноса энергии на гем цитохрома Р450 в ходе разложения диоксетанта. В пользу важной роли гема цитохрома Р450 в развитии люцифенин-зависимой хемилюминесценции микросом свидетельствуют данные об активирующем влиянии на эту реакцию СО [17], а также снижение ингибирующего действия саназола на хемилюминесценцию после обработки микросом СО (рис. 1).

Активация люцифенин-зависимой хемилюминесценции микросом различными фармакологическими агентами была зарегистрирована и ранее. Так, Barth с соавт. [6] сообщают об увеличении этого показателя на 50%

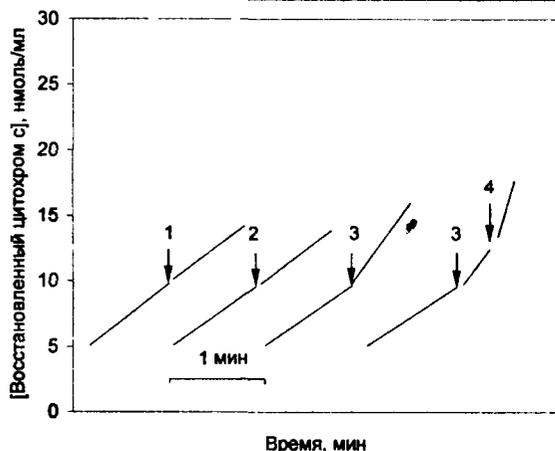


Рисунок 3.

Влияние люцигенина и производных азолов на скорость восстановления цитохрома с микросомами. Реакционная смесь содержала 100 мкМ NADPH, 40 мкМ цитохрома с и 200 мкг/мл микросомного белка. В указанные стрелочками моменты в кювету добавляли люцигенин или один из производных азолов: метронидазол (до 3 мМ) (1), аминотриазол (до 3 мМ) (2), саназол (до 3 мМ) (3) и люцигенин (до 60 мкМ) (4). По оси ординат - концентрация восстановленного цитохрома с, по оси абсцисс - время, мин.

денбуфиллином (1,3-ди-*n*-бутил-7(2-оксипропил)-ксантин) и на 28% набуметоном (4-(6-метокси-2-нафтил)-бутан-2-он). По мнению авторов работы, люцигенин адекватно отражает продукцию активных форм кислорода в суспензии микросом. Поскольку набуметон и денбуфиллин вызывали снижение образования продуктов перекисного окисления липидов микросом, то Varth с соавт. [6] вынуждены были сделать заключение, что образование активных форм кислорода и перекисное окисление липидов представляют собой явления не связанные между собой. В то же время, изложенные в настоящей работе представления о природе хемилюминесценции люцигенина в суспензии микросом позволяют удовлетворительно объяснить механизм модуляции этого процесса электронно-акцепторными соединениями, в том числе с антиоксидантными свойствами. Модулирующее действие различных агентов на хемилюминесценцию люцигенина в суспензии микросом следует оценивать как результат их влияния на эффективность транспорта электронов в ферментативной двухкомпонентной системе и/или гемсодержащую область цитохрома P450.

Производные азолов имеют различные противомикробные, противоопухолевые, радиосенсибилизирующие и иммунотропные свойства [9,14,20,21]. Биологическая активность промежуточных метаболитов этих соединений часто оказывается более высокой, чем у исходных агентов, что связано с взаимодействием высокорезакционных метаболитов с нуклеиновыми кислотами, небелковыми тиолами, белками, ненасыщенными липидами и другими макромолекулами [9,22]. В частности, в отношении нитроазолов это обусловлено одноэлектронным восстановлением нитрогруппы такими ферментами как ксантиноксидаза, цитохром P450-редуктаза и цитохром *b*₅-редуктаза [23]. Повышенная способность некоторых нитроазолов к ферментативному восстановлению может опосредовать их более высокую биологическую активность [24]. Хотя метронидазол способен восстанавливаться ксантиноксидазой [25], тем не менее скорость восстановления этим ферментом саназола много выше [17]. Представленные в настоящей работе данные позволяют также рассматривать NAD(P)H-редуктазы микросом как ферменты, участвующие в процессе биоактивации саназола и повышения его противоопухолевого, иммуномодулирующего и радиосенсибилизирующего действия.

ПРОИЗВОДНЫЕ АЗОЛА И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МИКРОСОМ

ЛИТЕРАТУРА

1. Шченеткин И.А. (1999) Биохимия, **64**, 34-43.
2. Liochev S.I., Fridovich I. (1997) Arch. Biochem. Biophys., **337**, 115-120.
3. Vasquez-Vivar J., Hogg N., Pritchard K.A.Jr. et al. (1997) FEBS Lett., **403**, 127-130.
4. Tsukamoto M., Tamro Y., Yonaha M. (1998) Biochem. Mol. Biol., **45**, 115-123.
5. Шченеткин И.А., Плотников В.М., Кагия В.Т. (2001) Вопр. мед. хим., **47**, 373-381.
6. Barth A., Kaiser N., Loffler U. et al. (1994) Exp. Toxicol. Pathol., **46**, 483-489.
7. Klinger W., Karge E., Demme U., Kretzschmar M. (2001) Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet., **26**, 31-35.
8. Klinger W., Lupp A., Karge E. et al. (2002) Toxicol. Lett., **128**, 129-144.
9. Muller M. (1983) Surgery, **93**, 165-171.
10. Shibamoto Y., Sakano K., Kimura R. et al. (1986) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., **12**, 1063-1066.
11. Коновалова Н.П., Волкова Л.М., Татьянаенко Л.В. и др. (1997) Вопр. онкологии, **43**, 309-312.
12. Чердынцева Н.В., Кокорев О.В., Малиновская Е.А. и др. (2000) Онкология, **2-4**, 272-274.
13. Konovalova N.P., Diatchkovskaya R.F., Volkova L.M., Kagiya T. (1996) Sensitization Newsletter., **2**, 3-6.
14. Konovalova N.P., Volkova L.M., Kagiya T. (1996) Sensitization Newsletter, **4**, 3-5.
15. Aragon C.M., Rogan F., Amit Z. (1992) Biochem. Pharmacol., **44**, 93-98.
16. Miyachi Y., Imamura S., Niwa Y. (1986) Br. J. Dermatol., **114**, 231-234.
17. Shchetkin I.A., Cherdyntseva N.V., Kagiya V.T. (2001) Pathophysiology, **8**, 119-127.
18. Куроптева З.В., Кудрявцев М.Е. (1997) Биофизика, **42**, 484-489.
19. Коор D.R. (1990) Chem. Res. Toxicol., **3**, 377-383.
20. Сибиряк С.В., Строкин Ю.В., Садыков Р.Ф., Дианов В.М. (1990) Хим.-фарм. журн., **11**, 19-24.
21. Huilgol N.G., Chatterjee N., Mehta A.R. (1996) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., **34**, 1121-1124.
22. Kedderis G.L., Argenbright L.S., Miwa G.T. (1989) Chem. Res. Toxicol., **3**, 146-149.
23. Smitskamp-Wilms E., Hendriks H.R., Perets G.J. (1994) Biochem. Pharmacol., **47**, 1325-1332.
24. Chapmen J.D., Baer K., Lee J. (1983) Cancer Res., **43**, 1523-1528.
25. Chrystal E.J.T., Koch R.L., Goldman P. (1980) Mol. Pharmacol., **18**, 105-111.

Поступила 07.06.02

EFFECT OF AZOLE DERIVATIVES ON THE LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF MICROSOMES

I.A. Shchetkin¹, R.R. Ahmedganov², V.T. Kagiya³

¹Institute of Oncology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634001 Russia, e-mail: oncology@info.tsu.ru

²Siberian State Medical University, 634050 Russia

³Kinki Invention Center, Kyoto 606, Japan

Both metronidazole and aminotriazole increased while sanazole (drug AK-2123) decreased the NADPH/lucigenin-dependent chemiluminescence of liver microsomes of phenobarbital-treated rats. Sanazole strongly inhibited the lucigenin-dependent chemiluminescence in the enzyme system of xanthine-xanthine oxidase. Aminotriazole and metronidazole were less potent inhibitors of chemiluminescence less than sanazole. All these azole derivatives did not absorb light in the region of light emission of lucigenin. Both lucigenin and sanazole increased the rate of cytochrome *c* reduction by microsomes in case of using NADPH as a donor of electrons, whereas no effect of metronidazole and aminotriazole on this rate was found. The sanazole inhibition of lucigenin-dependent chemiluminescence could reflect competition between sanazole and lucigenin for electrons in the active centre of flavin reductases. Thus, microsomal NAD(P)H-reductases can be potentially involved in a bioactivation of sanazole. Lucigenin-dependent chemiluminescence cannot be used for measuring the modulating action of agents on reactive oxygen species production in the microsomes, but it may be used for lumimetric studies of enzyme complex NAD(P)H-reductases/cytochrome P450 in model systems.

Key words: microsomes, lucigenin, chemiluminescence, nitroazoles, aminotriazole, cytochrome P450