

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР В ПРИСУТСТВИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.Е. ЗАКАРЯН, Н.А. САРКИСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375028

Исследовано влияние противоопухолевых препаратов на процесс перекисного окисления липидов при различных значениях pH среды и активность ферментов антиокислительной защиты – пероксидазы и супероксиддисмутазы биологической мишени. Обнаружено, что все испытуемые препараты подавляют свободнорадикальный окислительный процесс, что отражается в уменьшении уровня спонтанной хемилюминесценции и содержании конечного продукта окисления малонового диальдегида. Выявлено, что степень ингибирования неодинакова для разных препаратов и зависит от pH среды. Показано также, что активность ферментов биологической мишени уменьшается в присутствии противоопухолевых соединений, свидетельствуя об антиоксидантном характере действия последних.

Յետազոտված է հակաուռուցքային պրեպարատների ազդեցությունը կենսաբանական թիրախի լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վրա տարբեր pH դեպքում և հակաօքսիդային պաշտպանության համակարգի ֆերմենտների (պերօքսիդազա և սուպերօքսիդիդիսմուտազա) ակտիվության վրա: Բացահայտված է, որ բոլոր հետազոտվող պրեպարատները ճնշում են լիպիդների ազատ ռադիկալային օքսիդացումը, որը արտահայտվում է քիմյումիներսցենցիայի մակարդակի և օքսիդացման վերջնական արդյունքի մալոնային դիալդեհիդի կոնցենտրացիայի նվազմամբ: Ցույց է տրված, որ ինհիբացման աստիճանը տարբեր է հետազոտվող պրեպարատների համար և կախված է միջավայրի pH-ից: Բացահայտված է նաև, որ պերօքսիդազա և սուպերօքսիդիդիսմուտազա ֆերմենտների ակտիվությունը ընկնում է հակաուռուցքային պրեպարատների ազդեցության ներքո, որը վկայում է վերջինների հակաօքսիդային հատկությունների մասին:

The influence of some anticancer preparations on lipid peroxidation under different pH of solution and activity of enzymes of antioxidant defense system – peroxidase and superoxide dismutase was investigated. It was found out that these preparations suppressed lipid free radical oxidation, which is reflected by decrease of the level of chemiluminescence and concentration of an end product of lipid peroxidation – malone dialdehyde. It was shown that inhibitor activity is different for investigated preparations and depends on pH of solution. Also it was found that activity of enzymes is decreased under influence of anticancer preparations, which stated about their antioxidant activity.

*Перекисное окисление липидов - противоопухолевые препараты -
спонтанная хемилюминесценция - ферменты*

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и липидсодержащих структур, протекающие по свободнорадикальному механизму, играют большую роль в нормальной жизнедеятельности организма [3, 9]. Под влиянием различных факторов, например УФ и ионизирующей радиации,

а также при некоторых патологиях наблюдается изменение уровня этих процессов. В этом аспекте есть много данных по изучению этих нарушений, связанных с развитием злокачественных новообразований [1, 8]. Известно также, что важным этапом при лечении раковых заболеваний является химиотерапия, осуществляемая противоопухолевыми препаратами [14]. В литературе мало данных о взаимодействии противоопухолевых средств с биохимическими компонентами клетки [6, 10], однако вопрос о характере и механизмах этого взаимодействия представляется очень актуальным. В связи с этим нами изучалось влияние различных противоопухолевых препаратов на свободнорадикальное окисление липидов биологической мишени и активность ферментов антиокислительной защиты пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Материал и методика. Одним из лучших и объективных физических методов исследования процессов, протекающих по свободнорадикальному механизму, в том числе и ПОЛ является метод регистрации и изучения спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) [12, 13]. В данном случае в качестве хемилюминесцирующего объекта была использована биологическая мишень - гомогенат мозга крупного рогатого скота в трисНС1б-буфере (соотношение 1:10, рН 7,4). Для изучения действия противоопухолевых препаратов на интенсивность свечения биологическую мишень помещали в оптическую измерительную кювету в объеме 2 мл, а уровень ее СХЛ принимали за исходную величину. Далее к испытываемому образцу добавляли изучаемый препарат с конечной концентрацией 10^{-3} М. СХЛ регистрировали на квантометрической установке в импульсном режиме при температуре, близкой к физиологической ($40 \pm 0,5$) [4]. Изменение уровня свечения в присутствии растворов противоопухолевых веществ служило мерой для оценки активности испытываемых препаратов.

Действие противоопухолевых средств на ПОЛ изучали также по накоплению конечного продукта свободнорадикального окисления липидов - малонового диальдегида (МДА) по методу Стальной и Гаришвили [7].

С целью определения влияния исследуемых средств на пероксидазную активность этой биологической мишени, приготовленной в данном случае на основе фосфатного буфера (рН 7,0), был использован спектрофотометрический метод измерения оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении йодида калия за определенный промежуток времени [2].

Для оценки действия испытываемых противоопухолевых веществ на активность СОД биологической мишени в фосфатном буфере (рН 7,8) был использован метод определения активности указанного фермента, основанный на реакции фоторазложения нитросинего тетраозоля с образованием синего формазана [11].

В экспериментах были использованы противоопухолевые средства, а именно сарколизин, циклофосфан, тиофосфамид, 5-фторурацил, фторафур и колхицин из различных фармакологических групп.

Полученные результаты подвергали статистической обработке по критерию Стьюдента-Фишера и представлены в виде средних арифметических величин и их среднеквадратичных отклонений, что отражено на гистограммах и в таблице.

Результаты и обсуждение. Изучалось влияние исследуемых противоопухолевых препаратов на свободнорадикальный окислительный процесс биологической мишени при разных значениях рН среды. Из полученных экспериментальных данных следует, что при повышении рН от 6,5 до 8,0 наблюдается усиление активации свечения гомогената мозга от 68 ± 2 имп/10сек до 192 ± 4 имп/10сек, то есть более чем на 180%, что не противоречит литературным данным [5] (табл.). При воздействии противоопухолевыми соединениями на биологическую мишень наблюдается снижение интенсивности СХЛ, что, возможно, обусловлено антиокислительной активностью (АОА) испытываемых веществ. Как следует

Таблица 1. Влияние противоопухолевых препаратов на интенсивность спонтанной хемилюминесценции биологической мишени при различных значениях рН среды ($t 40^\circ$), (фон установки 30 ± 5 имп./10с)

рН	Гомогенат (контроль)	5-Фторурацил		Фторафур		Тиофосфамид		Циклофосфан		Сарколизин		Колхицин	
	интен- сив- ность СХЛ	интен- сив- ность СХЛ	% инги- бирования										
6,5	68 ± 2	57 ± 2	16	59 ± 6	13	58 ± 6	15	64 ± 6	6	60 ± 4	12	60 ± 6	12
7	130 ± 8	101 ± 4	22	102 ± 5	21	100 ± 3	23	102 ± 5	21	91 ± 3	30	79 ± 3	39
7,4	126 ± 6	103 ± 4	18	101 ± 6	20	98 ± 8	22	103 ± 3	18	93 ± 3	26	81 ± 5	36
8	192 ± 4	161 ± 7	16	143 ± 4	26	144 ± 4	25	147 ± 1	24	148 ± 2	23	135 ± 4	30

из приведенных данных, степень ингибирования неодинакова для разных препаратов и зависит от pH среды. Так, например, обнаруженная АОО исследуемых соединений имела наибольшее значение при нейтральных значениях pH среды (pH 7,0). При этом наибольшее ингибирование интенсивности свечения биологической мишени наблюдается при действии колхицина и сарколизина (39% и 30% соответственно). При повышении pH среды в сторону щелочных значений проявление антиокислительного действия противоопухолевых препаратов оказывается менее выраженным.

Далее изучалось действие противоопухолевых веществ на образование МДА, отражающее уровень свободнорадикального окисления биологической мишени. Было обнаружено, что все испытуемые препараты приводят к уменьшению образования МДА (рис.1) путем ингибирования цепного свободнорадикального окислительного процесса; при этом степень ингибирования опять-таки неодинакова для разных препаратов. Например, максимальная ингибирующая активность вновь проявляется в случае использования колхицина (60%), а минимальная – тиофосамида (12%).

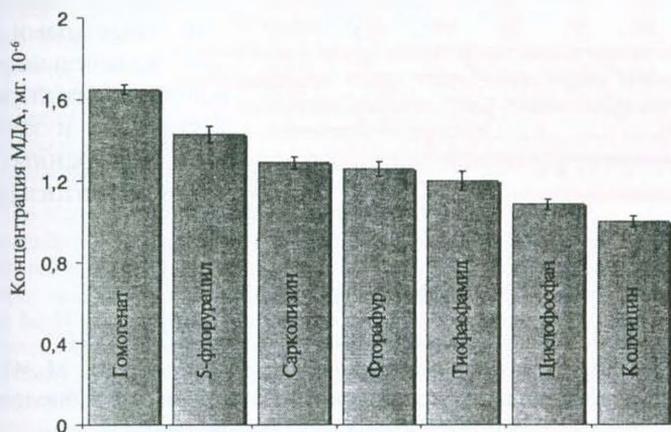


Рис.1. Изменение концентрации МДА под влиянием противоопухолевых препаратов

Таким образом, экспериментальные данные и в этом случае свидетельствуют об антиоксидантном характере действия изучаемых веществ на уровень свободнорадикального ПОЛ биологической мишени и согласуются с результатами, полученными при использовании метода ХЛ анализа.

В последующих экспериментах было изучено влияние исследуемых препаратов на активность ферментов антиокислительной защиты - пероксидазы и СОД (рис.2). Было выявлено, что активность ферментов уменьшается в присутствии противоопухолевых соединений в биологическом материале, при этом максимальное ингибирующее влияние этих препаратов наблюдается при использовании колхицина (40% и 50% соответственно). Как видно из приведенных данных, СОД по сравнению с пероксидазой более чувствительна к действию изучаемых веществ.

Из литературы [3, 6, 8] известно, что при росте злокачественных опухолей, как правило, увеличивается потребность в антиоксидантах (АО), что отражается падением уровня свободнорадикального окисления липидов и угнетением интенсивности СХЛ. Однако в связи с тем, что эти препараты

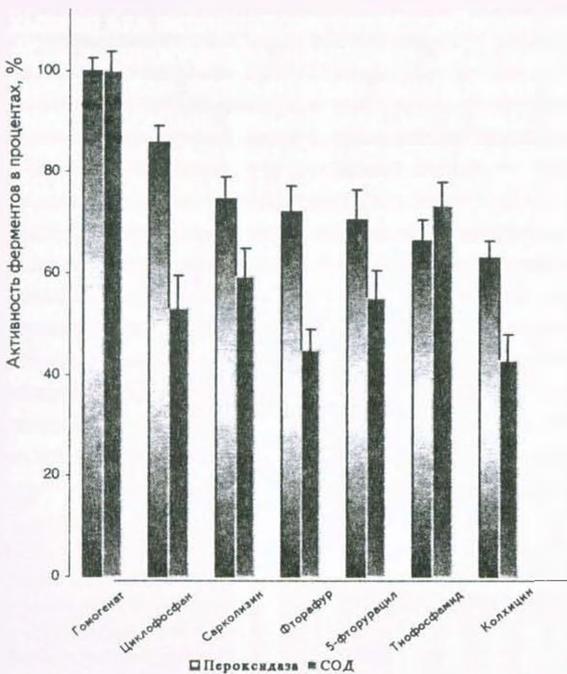


Рис. 2. Ингибирование противоопухолевыми препаратами активности ферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы.

ингибируют и активность ферментов антиокислительной защиты, впоследствии их роль в качестве классических АО сводится к минимуму, хотя они все-таки могут играть некоторую мембраностабилизирующую роль.

Таким образом, все изучаемые препараты проявляют антиоксидантный характер при применении различных методических подходов исследования. Это означает, что при обсуждении механизмов биологического действия вышеуказанных препаратов, наряду с общеизвестными объяснениями, желательно учитывать и их антиоксидантную роль для стабилизации и защиты клеточных мембранных структур во время малигнизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Благосклонный М.В.* Успехи соврем. биологии, 3, 2, 260-275, 1991.
2. *Ермаков А.И.* Методы биохимического исследования растений, М., 41-42, 1982.
3. *Закарян А.Е.* Свободнорадикальное окисление липидов в биологических и модельных системах в норме и патологии, Ереван, 1995.
4. *Закарян А.Е., Цагикян А.Р., Погосян Г.А., Паносян Г.А.* Биолог. журн. Армении, 43, 51, 1, 1990.
5. *Панасенко О.М., Арнхольд Ю., Серменко В.И.* Биофизика, 51, 3, 463-469, 1998.
6. *Серкиз Я.И., Чеботарев Е.Е., Барабой В.А. и др.* Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии. Киев, Наукова Думка, 1984.
7. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В. Н.), М., Медицина, 66-68, 1977.
8. *Тарусов Б.Н.* Биофизика рака, Киев, Наукова Думка, 107-120, 1976.
9. *Benzol F.F.* Lipid peroxidation. Inf. T. Food. Sci. and Nuter, 47, 3, 233-261, 1996.
10. *Durnev A.D., Sazontova T.G., Guseva M.V., Seredenin S.B.* Biull. Eksp. Biol. Med., 5, 121, 528-532, 1996.
11. *Fried R.* Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. Biochemie, 57, 657-660, 1975.
12. *Kondo Y., Ohnishi M., Kawaguchi M.* J. Agric. Food. Chem., 5, 47, 1781-1785, 1999.
13. *Kuzmenko A.I., Morozova R.P., Nikolenko I.A., Donchenko G.V.* Jablonski Centennial Cont. Luminescence and Photophys, Torun, Book Abstr., p.172, 1998.
14. *Lennard L.* Brit. J. Clin. Pharmacol., 47, 2, 131-143, 1999.

Поступила 12.XII.2003