

УДК 577.539.612.14

Л. Г. Тадевосян

Влияние доксорубицина на уровень и активность металлопротеинов
из тканей крыс *in vitro*

(Представлено академиком А.А. Галояном 4/VIII 2010)

Ключевые слова: доксорубицин, металлопротеины, активности, супероксидный радикал

Доксорубицин (ДР) является потенциальным антиопухолевым препаратом при терапии различных видов злокачественных опухолей (лейкемия, лимфома, опухоли молочной железы, легких, яичников, поджелудочной железы и др.) [1]. Однако длительное употребление ДР вызывает необратимую кардиомиопатию путем стимулирования образования свободных кислородных радикалов, которые нарушают функционирование митохондрий и других клеточных образований сердечной ткани. При этом дексразоксан подавляет ДР-индуцированную кардиотоксичность, снижая уровень продуцированных O_2^- [2]. В опытах *in vitro* препарат крисоериол (флавоновое соединение) существенно снижает ДР-индуцированный апоптоз и гибель клеток HSc2 путем снижения уровня малонового диальдегида и повышения активности супероксид дисмутазы (СОД) и глутатион пероксидазы (ГПО) [3]. При инкубировании ДР со свеженабраными тромбоцитами человека *in vitro* наблюдаются дозозависимое индуцирование токсичности тромбоцитов на фоне повышения генерации O_2^- , снижения уровня глутатиона, а также расщепление тиоловых групп белков.

При инкубации ДР с р53 остеосаркоматическими клетками человека (Saos-2) *in vitro* в течение 48 ч наблюдаются повышение уровня внутриклеточных H_2O_2 и O_2^- , а также деполяризация митохондриальных мембран, высвобождение цитохрома С, активация каспаз [4]. При взаимодействии ДР *in vitro* с клетками крови человека (ПМН лейкоциты и клетки K562) препарат

нарингенин подавляет рост активных форм кислорода (АФК) и перекисное окисление липидов, индуцированных ДР, происходит повышение активности СОД и ГПО в ПМН лейкоцитах, однако эти показатели практически не изменяются в K562 клетках. Таким образом, нарингенин снижает фон оксидативного повреждения, вызванного ДР, в нормальных клетках крови, но не в K562 клетках [5].

Использование ДР как противоопухолевого агента ограничивается из-за его кардиотоксичного эффекта. Гибель клеток сердца под влиянием ДР является ключевым фактором кардиотоксичности. Однако механизм такого эффекта еще окончательно не выявлен. Показано, что пероксинитрит является ключевым фактором при ДР индуцированной гибели кардиоцитов *in vivo* и *in vitro* [6].

NAD(P)H-оксидаза, которая включена не только в процесс опухолеобразования, но и используется ДР как противоопухолевый агент, является ключевым эндогенным источником АФК [7]. Одним из механизмов кардиотоксичности ДР является повышение продуцирования АФК митохондриальной NADPH-дегидрогеназой, которая вызывает апоптоз кардиомиоцитов [8]. Однако NADPH-оксидаза также является мембраносвязанным ферментом и за счет интенсивного продуцирования O_2^- вызывает апоптоз клеток сердечной ткани под влиянием ДР (наблюдается активация NADPH-оксидазы). При ингибировании NADPH-оксидазы апоцинином или дифенилйодонином наблюдается снижение уровня АФК и активности каспаз-3. Таким образом, NADPH-оксидаза вовлечена в процесс ДР-зависимого апоптоза клеток сердечной ткани, однако в настоящее время отсутствуют данные о непосредственном влиянии ДР на уровень, опико-спектральные характеристики и активность ключевых металлопротеинов крови и селезенки крыс – регуляторов метаболизма АФК.

Целью настоящей работы являлось определение характерных изменений на опико-спектральном уровне, а также изменений NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ цитохрома (цит) b_{558} кислого характера из эритроцитарных мембран (ЭМ), мембран клеток селезенки (МКС), сыворотки крови (экстрацеллюлярный цит b_{558}), супрола (супероксидпродуцирующего липопротеина высокой плотности сыворотки), а также активности ключевых металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО) Cu,Zn-СОД и каталазы под непосредственным влиянием ДР *in vitro*.

Электрофоретически гомогенные препараты изоформ цит b_{558} кислого характера (получены в лаборатории метаболизма активного кислорода Института биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА) выделяются из сыворотки крови.

ЭМ, МКС крыс лицензированным способом (без применения детергентов для солюбилизации мембранных цит b_{558} , т.к. детергент существенно снижает стабильность и активность этих гемопротеинов) [9]. МАА (Cu,Zn-СОД, каталаза), супрол также получают лицензированным способом в указанной лаборатории [10]. В первой серии экспериментов цит b_{558} кислого характера из ЭМ ($A_{530} = 0.8$), МКС ($A_{530} = 0.8$), сыворотки крови (экстрацеллюлярный цит b_{558}) ($A_{530} = 0.15$) по 3 мл, Cu, Zn-СОД по 3 мл (500 ед/мг) и каталаза (2000 ед/мг) из печени быка были инкубированы с 0.1 мг (0.03 мг/мл) ДР (наиболее эффективная концентрация ДР) *in vitro* в течение 24 ч при 4° . В контрольных опытах вместо ДР использовали 0.05 мл 0.9% NaCl. В конце инкубации металлопротеинов с ДР следы ДР удаляли диализом против воды. Во второй серии экспериментов инкубацию крови (по 5мл) с ДР (по 0.03 мг/мл) осуществляли в течение 4 суток при 4° (в контрольных пробах в сыворотку добавляли 0.05 мл 0.9% NaCl), после чего из этих проб выделяли экстрацеллюлярный цит b_{558} методом ионообменной хроматографии на сепрадексе DEAE A-50 и целлюлозе DE-52 [10].

СОД активность и NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность определяли нитротетразолиевым синим (НТС) путем измерения плотности максимального оптического поглощения формазана (при A_{560} нм), образовавшегося в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу активности СОД принимали количество фермента, снижающее образование формазана на 50%. За единицу NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ цит b_{558} кислого характера принимали количество гемопротеинов, повышающее плотность оптического поглощения формазана (при A_{560} нм) на 50%. Каталазную активность определяли перманганометрическим титрованием растворов H_2O_2 в отсутствие и в присутствии каталазы. За единицу каталазной активности принимали количество каталазы, расщепляющей 0.1М H_2O_2 в течение 1 мин при 20° . ФерриHb-восстанавливающую активность изоформ цит b_{558} определяли кинетическим методом [11] путем измерения снижения плотности α -поглощения (при 565 нм) ферриHb под влиянием этих цитохромов. За единицу ферриHb-восстанавливающей активности принимали количество цит b_{558} , способное снизить плотность α -поглощения ферриHb до 0.05 оптической единицы в течение 30 мин при 36° . Опыты повторялись 6 раз, а статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности P. Оптические спектры поглощения были регистрированы на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В ходе экспериментов использовались также

центрифуги К-70 и К-24 (Германия).

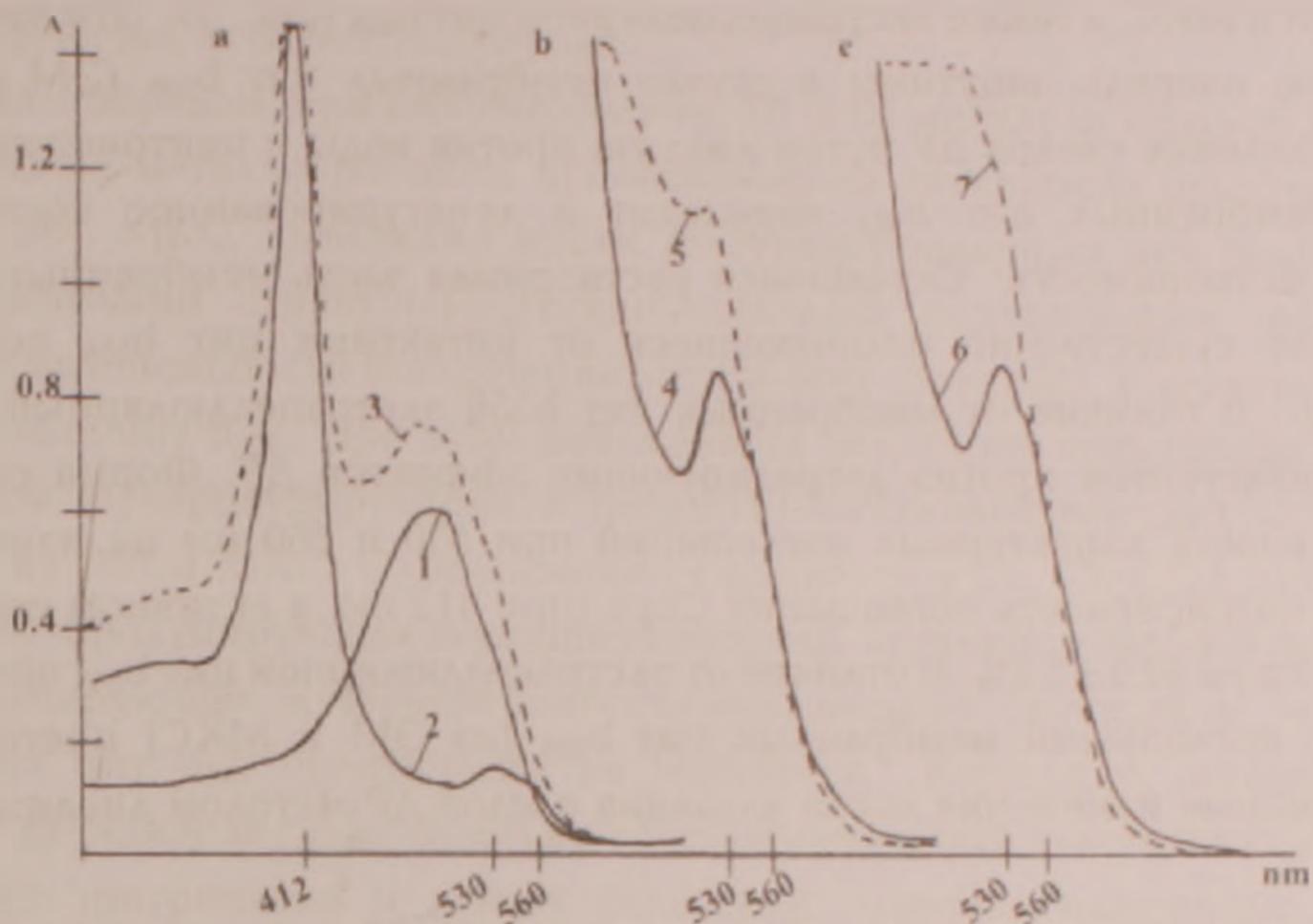


Рис. 1. Оптические спектры поглощения изоформ цит b_{558} кислого характера под влиянием ДР (0.03 мг/мл) после его 24 ч инкубирования с этими гемопротейнами при 4°C : а – оптические спектры поглощения: ДР (1), экстрацеллюлярный цит b_{558} до (2) и после (3) его инкубирования с ДР; б – оптические спектры поглощения цит b_{558} кислого характера из ЭМ крыс до (4) и после (5) инкубирования с ДР; с – оптические спектры поглощения цит b_{558} кислого характера из МКС крыс до (6) и после (7) инкубирования с ДР.

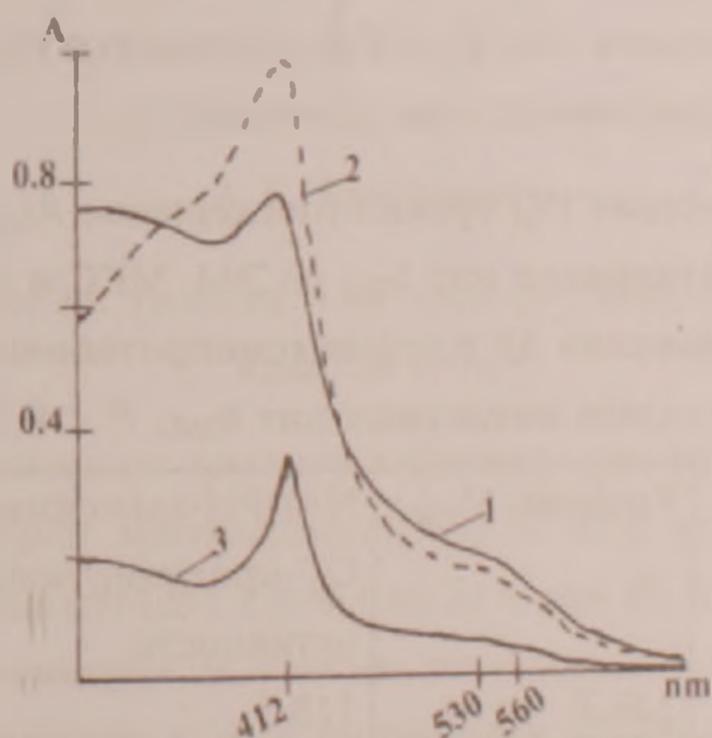


Рис. 2. Оптические спектры поглощения изоформ цит b_{558} кислого характера из МКС, ЭМ и экстрацеллюлярного цит b_{558} крыс после 24 ч инкубирования с ДР, диализа против воды и центрифугирования: 1 – для цит b_{558} МКС (10 мл); 2 – для цит b_{558} ЭМ (8.5 мл); 3 – для экстрацеллюлярного цит b_{558} (11 мл).

В первой серии экспериментов инкубирование ДР непосредственно с изоформами цит b_{558} в указанных условиях *in vitro* приводит к существенным

изменениям оптико-спектральных свойств изоформ цит b_{558} кислого характера из ЭМ и МКС, а также экстрацеллюлярной цит b_{558} (рис. 1). Эти изменения, в первую очередь, ощутимы в случае мембранных цит b_{558} (ЭМ и МКС). После удаления следов ДР путем диализа против воды и центрифугирования часть мембранных цит b_{558} переходит в денатурированное состояние и теряет растворимость. Оставшаяся растворимая часть мембранных цит b_{558} проявляет существенно отличающиеся от интактных цит b_{558} показатели (рис. 2). В отличие от мембранных цит b_{558} экстрацеллюлярный цит b_{558} более резистентен против деградирующих эффектов ДР. Форма спектра и интенсивность характерных поглощений при 530 и 560 нм не изменяются. Однако интенсивность поглощения *Soret* (при 412 нм, в активном состоянии) снижается на $52.3 \pm 8.4\%$. В отличие от экстрацеллюлярной цит b_{558} оптические спектры поглощений мембранных цит b_{558} (из ЭМ и МКС) претерпевают существенные изменения после удаления следов ДР методом диализа против воды.

Интенсивность поглощений β -полосы (при 530 нм) и поглощение *Soret* этих цит b_{558} резко снижаются, изменяется и форма спектров (рис. 2). Можно констатировать, что ДР пагубно действует на хромофорную группу мембранных цит b_{558} , в отличие от показателей экстрацеллюлярной цит b_{558} . Однако эти изменения не вызывают снижения NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности, она даже повышается (таблица), в отличие от ферриHb-восстанавливающей активности, которая снижается под влиянием ДР. В результате инкубации ДР с Cu, Zn-СОД и каталазой в приведенных условиях *in vitro* активность Cu, Zn-СОД снижается на $31.4 \pm 4.4\%$ ($P < 0.03$), а активность каталазы практически не изменяется.

Относительное изменение (%) уровня (поглощение A_{530}) NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b_{558} из ЭМ, МКС и экстрацеллюлярной цит b_{558} после 24 ч инкубирования ДР с этими гемопротейнами, по сравнению с 100% показателями интактных цит b_{558} , $P < 0.05$, $n = 6$

Цит b_{558} из	Уровень (A_{530})	NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность	МетHb-восстанавливающая активность
ЭМ крыс	↓57.7	↑18.3	↓21.4
МКС крыс	↓42.5	↑10.9	↓18.9
Сыворотки крови крыс (экстрацеллюлярный цит b_{558})	0	↑12.3	↓10.1

Во второй серии экспериментов при инкубировании сыворотки крови крыс с ДР уровень NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-

восстанавливающей активности экстрацеллюлярных цит b_{558} [11] существенным изменениям не подвергался. Незначительно менялась и O_2^- -продуцирующая активность супрола.

Таким образом, при инкубировании ДР (0.03 мг/мл) *in vitro* его действие на ключевые металлопротеины прооксидантной активности (изоформы цит b_{558}) из ЭМ, МКС, сыворотки крови (экстрацеллюлярный цит b_{558}) связано с необратимыми структурно-функциональными нарушениями (изменения формы и интенсивности поглощения оптических спектров), в первую очередь, мембранных цит b_{558} . При этом наблюдается некоторое повышение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности цит b_{558} из ЭМ и МКС. Одновременно снижается и Cu, Zn-SOD активность, однако O_2^- -продуцирующая активность супрола, каталазы и NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность экстрацеллюлярных цит b_{558} практически не меняются. Возможно, именно таким образом ДР изменяет окислительно-восстановительный статус и кислородный гомеостаз эритроцитов и клеток селезенки, вызывая нарушение их нормального функционирования. Этим путем ДР может способствовать гибели опухолевых клеток. Не исключена также его роль в нарушении функционирования и нормальных клеток (в частности эритроцитов и клеток селезенки) у больных с опухолями, из чего следует необходимость более осторожного выбора употребляемой дозы и периодичности его использования в клинике.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

Л. Г. Тадевосян

Влияние доксорубицина на уровень и активность металлопротеинов из тканей крыс *in vitro*

После инкубации изоформ кислого характера цитохрома b_{558} (цит b_{558}) (по 3 мл), полученных из мембран эритроцитов ($A_{530} = 0.8$), мембран клеток селезенки ($A_{530} = 0.8$), с доксорубицином (ДР) в течение 24 ч при 4^0 , наблюдается значительное снижение оптических спектров и уровня мембранного цитохрома b_{558} при 412 нм. Эти изменения приводят к повышению (на 10-20%) NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности и снижению (10-20%) ферриHb-восстанавливающей активности цит b_{558} . Одновременно снижается (на 30-32%) и Cu, Zn-SOD активность, однако O_2^- -продуцирующая активность супрола, активность каталазы и NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность экстрацеллюлярных цит b_{558} практически не изменяются.

Таким образом, ДР может влиять на свойства мембранных цит b_{558} , нарушая окислительно-восстановительный статус и кислородный гомеостаз эритроцитов.

L. Ն. Թադևոսյան

Դոքսորուբինի ազդեցությունը առնետների հյուսվածքների մեմբրանապրոտեինների մակարդակների և ակտիվությունների վրա *in vitro*

Էրիթրոցիտների թաղանթներից ($A_{530} = 0.8$), փայծաղի բջջաթաղանթներից ($A_{530} = 0.8$) ստացված 3-ական մլ թթվային բնույթի ցիտոքրոմ (ցիտ) b_{558} իզոմերների և դոքսորուբինի (ԴՌ) (0.03 մլ/մգ), 24 ժ 4° -ում ինկուբացիայից հետո 412 նմ-ում դիտվում է այդ թաղանթային ցիտ b_{558} օպտիկական կլանման սպեկտրների զգալի նվազում և մակարդակների իջեցում (ազդեցացման խթանման շնորհիվ մինչև 40-50%): Այդ փոփոխությունները հանգեցնում են ցիտ b_{558} NADPH-կախյալ O_2^- արտադրող ակտիվության 10-20%-ով բարձրացմանը և մեթեմբ վերականգնող ակտիվության 10-20%-ով նվազմանը: Այս պայմաններում ԴՌ-ն գործնականորեն չի փոխում արյան շիճուկից ստացված արտաբջջային ցիտ b_{558} մակարդակը, NADPH-կախյալ O_2^- արտադրող և մեթեմբ վերականգնող ակտիվությունը և օպտիկական կլանման սպեկտրի ձևը: ԴՌ-ի հետ ինկուբացումը չի հանգեցնում շիճուկից ստացված և O_2^- արտադրող լիպոպրոտեինի՝ սուպրոլի ակտիվության փոփոխմանը, չի փոխվում նաև կապուլազի ակտիվությունը, սակայն նվազում է (30-32 %) Cu, Zn|ՍՕԴ-ի ակտիվությունը:

Այսպիսով, ԴՌ կարող է փոփոխել թաղանթային ցիտ b_{558} հատկությունները՝ հանգեցնելով էրիթրոցիտների օքսիդավերականգնման կարգավիճակի և թթվածնային հոմեոստազի որոշակի շեղման:

L. H. Tadevosyan

The Influence of Doxorubicin on the Level and Activity of Rat Tissue Metalloproteins *in vitro*

After the incubation of doxorubicin (DR) (0.03 mg/ml) with 3 ml acidic isoforms of cytochrome b_{558} from erythrocytes membranes ($A_{530} = 0.8$), spleen cell membranes, ($A_{530} = 0.8$), during 24 h at 4° , 40-50% decrease of optical absorption spectrum intensity at 412 nm, (A_{530} nm) to (as a result of the aggregation) and 10-20% of ferrihemoglobin (ferriHb)-reducing activity as well as increase of NADPH dependly O_2^- -producing activity (10-20%) took place. In these conditions DR doesn't change the level of NADPH depending O_2^- producing and ferriHb reducing activities and the form of optical spectrum of extracellular cyt b_{558} (from blood serum). The O_2^- -producing activity of suprol (O_2^- -producing lipoprotein), as well as catalase activity are not changed, moreover in these conditions the Cu, Zn - SOD activity decreases to 30-32%. Thus, it is possible that DR can change the oxidation-reduction status of red blood cells and spleen cells.

Литература

1. Injac R., Strukelj B. - *Technol. Cancer Res. Treat.* 2008. V. 7(6). P. 497-516.
2. Che F.F., Liu Y., Xu C.G. - *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010. V. 41(1). P. 24-28.
3. Liu Z., Song X.D., Xin Y., Wang X.J., Yu H., Bai Y.Y., Liu J.H., Zhang C.N., Hui R.T. - *Chin Med. J. (Engl).* 2009. V. 122(21). P. 2652-2656.
4. Kim E.J., Lim K.M., Kim K.Y., Bae O.N., Noh J.Y., Chung S.M., Shin S., Yun Y.P., Chung J.H. - *J. Thromb. Haemost.* 2009. V. 7(7). P. 1172-1183.
5. Feng Y.Q., Zuo X.L., Li R.F., Zhang K.J., Chen F., Xiao H. - *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2008. V. 16(4). P. 790-793.
6. Mukhopadhyay P., Rajesh M., Batkai S., Kashiwaya Y., Hasko G., Liaudet L., Szabo C., Pacher P. - *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009. V. 296(5) H1466-483
7. Hoffmann M., Schirmer M.A., Tzvetkov M.V., Kreuz M., Ziepert M., Wojnowski L., Kube D., Pfreundschuh M., Trumper L., Loeffler M., Brockmoller J. - *Cancer Res.* 2010. V. 70(6). P. 2328-2338.
8. Gulleron M., Marechal X., Montaigne D., Franczak J., Nevriere R., Lancel S. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 388(4). P. 727-731.
9. Симомян Г.М., Симомян Р.М., Симомян М.А. Способ получения цитохромов типа b из клеточных компонентов. Лицензия изобретения Армпатента А2233. Ереван. 2008.
10. Симомян М.А., Симомян Г.М., Симомян Р.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобрет. Армпатента 341, Ереван. 1997.
11. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A. - *NAS RA Electronic J. of Natural Sciences.* 2006. V. 2(7). P. 3-6.
12. Симомян Г.М., Симомян Р.М., Симомян М.А. - *Мед. наука Армении.* 2005. Т. 45(2). P. 26-29.