

Влияние соединения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида на эндогенный уровень металлопротеинов и малонового диальдегида в печени крыс на начальной стадии развития саркомы-45

Г.М.Галоян

*Кафедра фармацевтической химии ЕГУ
Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА
0025, Ереван, ул. А.Манукяна, 1*

Ключевые слова: 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид, саркома-45, малоновый диальдегид, металлопротеины, печень

Активные формы кислорода (АФК) являются ключевыми факторами развития злокачественных новообразований (метастаз) [14,19]. Основными источниками продуцирования АФК являются НАДРН-оксидазы, локализованные в первую очередь в мембранах клеток иммунной системы [18], причем продуцирование АФК в большинстве случаев увеличивается при канцерогенезе [9,12]. Однако АФК при накоплении вызывают оксидативное повреждение ДНК опухолевых клеток, подавляют их рост и вызывают апоптоз последних [8,11,13]. При саркоме-45 (С-45) и саркоме Эрлиха эти изменения ассоциируются с отклонением антиоксидантного и прооксидантного статуса крови и печени, функционированием митохондрий, метаболизмом NO, ингибированием антиоксидантной системы, снижением стабильности эритроцитов и повышением степени анемии [10]. Соединения (интерферон-бета, ретиноевая, кофеиновая и фериликовая кислота), стимулирующие НАДРН-оксидазы, вызывают апоптоз и снижение прогрессирования опухолевых клеток [7]. Фактически и снижение, и повышение физиологического уровня АФК (супероксидных радикалов) отрицательно влияют на состояние опухолевых клеток. С этой точки зрения определенный интерес представляет выявление молекулярно-биохимических механизмов воздействия 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида (ЦТБО) – соединения, обладающего СОД-миметической активностью при канцерогенезе.

Целью работы является определение характерных изменений эндогенного уровня и активности металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) и металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО), а также продукта липидной пероксидации – малонового диальдегида (МДА) в печеночной ткани белых крыс на начальных этапах развития С-45 под влиянием экзогенно введенного ЦТБО.

Материал и методы

Белые беспородные крысы-самцы массой 160-180 г., содержащиеся на полноценном режиме в течение месяца до начала эксперимента, были разделены на три группы (по 12 в каждой). Ткань С-45 (5г) размельчали специальной установкой, не повреждая клетки в 20 мл физиологического раствора. Животным первой опытной группы (ОГ-1) подкожно вводили по 1 мл этой смеси опухолевых клеток. Животным ОГ-2 вводили клетки С-45 и через 3 дня в том же объеме вводили внутривенно 17 мг/кг ЦТБО каждый день в течение 8 дней. Контрольным животным вместо ЦТБО вводили физраствор в аналогичном режиме. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом на 15-й день опыта. Печень животных подвергали перфузии физраствором и гомогенизировали в 0,04 М калий фосфатном буфере, рН 7,4 (КФБ). Гомогенизацию печени (10 г) проводили в 40 мл КФБ. По 3 мл из этого гомогената отделяли

для определения количества МДА оптическим спектральным методом [1]. МАА (Cu,Zn-СОД, Мп-СОД и каталаза) и МПА (фракция новой изоформы цитохрома b558, цитохрома С) получали из печени и количественно определяли биотехнологическим способом без использования детергента, который отрицательно влияет на эти металлопротеины (МП) [3,5], используя вместо крови и эритроцитарных мембран гомогенат и мембраны клеток печени (МКП). Белковые фракции гомогената и МКП после диализа и удаления нерастворимых остатков подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52 и ДЕ-52 (Whatman, Англия).

Количество полученных МП определяли на основании оптических плотностей: для цитохрома (цит) С при 520 нм, фракции цит b558 – 530 нм. СОД-активность фракций и НАДРН-зависимую супероксид (O_2^-)-продуцирующую активность фракции цит b558 в гомогенной и гетерогенной фазах (в МКП) определяли нитротетразолиевым синим методом [2].

Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающую активность фракции цит b558 МКП в гомогенной фазе определяли оптическим спектральным методом, путем вычисления процента снижения плотности максимального оптического поглощения при 565 нм метНб крыс (A_{565} в реакционной смеси составляло 0,8) в присутствии фракции цит b558 (A_{530} в реакционной смеси составляло 0,03). Для определения метНб-восстанавливающей активности фракции цит b558 в гетерогенной фазе (в МКП) к 3 мл реакционной смеси добавляли 0,2 мл МКП с 0,04 М КФБ [16].

Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода в отсутствие и присутствии каталазной фракции.

Гомогенизацию печеночной ткани проводили на размельчителе тканей со скоростью вращения ножей 3000 об/мин в течение 3 мин при 4°. Оптические спектральные измерения проводили на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

Результаты и обсуждение

На начальных стадиях развития С-45 в течение 15 дней в ОГ-1 и ОГ-2 гибель животных не наблюдалась. Средняя масса опухолей в ОГ-1 составила $1,2 \pm 0,1$ г, в ОГ-2 – $0,9 \pm 0,1$ г ($P < 0,05$). При этом подкожная распространенность опухолевых очагов в ОГ-1 превышала аналогичную в ОГ-2 в 1,9 раза. Следовательно, противоопухолевое действие ЦТБО заключается в предотвращении распространенности опухоли и подавлении его роста ($40,0 \pm 4,3\%$, $P < 0,03$).

В ОГ-1 наблюдается увеличение эндогенного уровня фракции цит b558 [4]. Это ассоциируется с увеличением НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b558 МКП в гомогенной и гетерогенной фазах. Однако в ОГ-1 метНб-восстанавливающая активность цит b558 снижается, особенно в гетерогенной фазе. Это свидетельствует о том, что цит b558 МКП претерпевает качественное изменение. Снижение метНб-восстанавливающей активности цит b558 МКП может отрицательно влиять на кислородный гомеостаз, ассоциированный с повышением степени анемии, что является новым механизмом индуцирования анемии при канцерогенезе [2]. Однако увеличение НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности фракции цит b558 МКП, с одной стороны, может вызывать стимулирование иммунной системы, для которой НАДРН-оксидаза является основным источником продуцирования O_2^- (цит b558 является ключевым компонентом этой комбинированной оксидазы) [18], с другой – увеличение уровня O_2^- (соответственно перекиси водорода и гидроксильных радикалов) может вызывать оксидативное повреждение окружающих биосистем [6].

Снижение уровня цит С в клетках (митохондриях) печени крыс при С-45 (ОГ-1) свидетельствует об ослаблении процессов дыхательной цепи митохондрий, однако это компенсируется некоторым увеличением уровня цит b558 в клетках печени. С другой стороны, увеличение уровня МДА в печени в ОГ-1 может быть связано с повышением уровня O_2^- -продуцируемых цит b558 (O_2^- и $HO\cdot$ стимулируют перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов биомембран) [6]. При участии цит b558 стимули-

руется продуцирование O_2^- и перекиси водорода в митохондриях печени [17], а эти АФК являются потенциальными канцерогенными агентами, путем повреждения ДНК [18]. АФК отрицательно

действуют и на МАА [15], что выражается снижением активности этих МП в клетках почек в ОГ-1 (таблица).

Таблица

Относительное изменение (%) уровня и активности про- и антиоксидантных МП и МДА в печени крыс при С-45 под влиянием ЦТБО в лечебном режиме, по сравнению с 100% контрольными показателями ($P < 0,05$, $n = 8$)

МП, активность, МДА	ОГ-1 (С-45)	ОГ-1 (С-45 + ЦТБО)
Уровень фракции цит b558 из МКП	+ 28,7 ± 4,1	+ 16,1 ± 2,2
НАДРН-зависимая O_2^- - продуцирующая активность фракции цит b558 МКП в гомогенной фазе	+ 24,8 ± 2,3 ($P < 0,03$)	+ 11,3 ± 2,0 ($P < 0,03$)
НАДРН-зависимая O_2^- - продуцирующая активность фракции цит b558 МКП в гетерогенной фазе	+ 41,3 ± 3,3	+ 34,8 ± 4,9
МетНб-восстанавливающая активность фракции цит b558 МКП в гомогенной фазе	- 35,7 ± 3,6	- 10,3 ± 1,8
МетНб-восстанавливающая активность фракции цит b558 МКП в гетерогенной фазе	- 51,4 ± 4,3	- 20,2 ± 3,1
Цит С	-36,7 ± 4,1	-24,9 ± 3,0
МДА	+ 19,3 ± 3,4 ($P < 0,03$)	+ 10,8 ± 1,2 ($P < 0,03$)
Суммарная фракция Cu,Zn-СОД и Mn-СОД	-31,5 ± 2,1	-18,4 ± 3,0
Каталаза	-22,9 ± 2,7 ($P < 0,03$)	-8,4 ± 0,8 ($P < 0,03$)

Экзогенно введенный ЦТБО (в приведенной более эффективной концентрации) оказывает положительный регулирующий эффект на МАА и МПА (таблица), видимо, путем улавливания O_2^- . Это в свою очередь снижает степень оксидативного повреждения клеток печени, несколько стимулирует кислородный гомеостаз и снижает степень анемии. Эти изменения так или иначе повышают резистентность организма к оксидативному стрессу при канцерогенезе.

Можно заключить, что экзогенно введенный ЦТБО в лечебном режиме играет антистрессорную, антиканцерогенную роль на начальных этапах развития С-45. Это дает основание для дальнейшего определения влияния ЦТБО на аналогичные показатели крови при С-45 и предложения его для предклинического испытания.

Поступила 26.06.07

2-ցիան-3,4,4-տրիմեթիլ-2-բուտեն-4-օլիդ միացության ազդեցությունը մետաղապրոտեինների և մալոնային դիալդեհիդի էնդոգեն մակարդակի վրա առնետի լյարդում սարկոմա-45-ի զարգացման սկզբնական փուլում

Գ.Մ. Գալոյան

Առնետների մոտ՝ սարկոմա-45-ի (Ս-45-ի) զարգացման սկզբնական փուլում (15 օրվա ընթացքում), դիտվում է լյարդի բջիջների բաղաձայնության անջատված ցիտոքրոմ b558-ի նոր իզոմերի ֆրակցիայի մակարդակի և ՆԱԴՊՀ-կախյալ O_2^- - գոյացման ակտիվության աճ, մետHb-վերականգնման ակտիվության նվազում: Միաժամանակ կատարվում է լյարդում Cu, Zn - ՍՕԴ-ի, Mn-ՍՕԴ-ի և կատալազի ակտի-

վության անկում և մալոնային դիալդեհիդի մակարդակի աճ: Ներքոնվայնային ներարկված 2-ցիան-3,4,4-տրիմեթիլ-2-բուտեն-4-օլիդ միացությունը (17մգ/կգ, 8 անգամ) ցուցաբերում է հակասթրեսային և հակաուռուցքային ազդեցություն, վերոհիշյալ ցուցանիշները մոտեցնելով նորմային և մինչև 40%-ով կանխելով Ս-45-ի աճը:

The influence of 2-cian-3,4,4-trimethyl -2-buten-4-olid compound on the metalloproteins and malonic dialdehyde endogeneous levels in rat liver at initial stage of sarcoma -45 growth

G.M.Galoyan

An increase in the levels of NADPH-depending O_2^- -producing and methemoglobin-reducing activity of the fraction of new isoform of cytochrome (cyt) b558 from rat liver cell membranes is observed at the initial stage (during 15 days) of the sarcoma-45 (S-45) growth. Simultaneously a decrease in the Cu,Zn-SOD,

Mn-SOD and catalase activities and an increase in the malone dialdehyde level in the liver take place. Intraperitoneal injecteion of 2-cian-3,4,4-trimethyl -2-buten-4-olid (17 mg/kg, 8 times) shows antistressory and antitumor effects bringing these data to the norm and decreasing the S-45 growth to 40%.

Литература

1. Владимирев Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление в биологических мембранах. М., 1972.
2. Симосян Г.М. Автореф.канд.дис. "Окислительный стресс при злокачественных новообразованиях". Ереван, 2003.
3. Симосян Г.М., Симосян М.А., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобретения N908 Армпатента. Ереван, 2001.
4. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Галоян А.А., Симосян М.А. БПП-1 стимулирует метHb-восстанавливающую и понижает НАДРН-зависимую активность новых изоформ цитохрома b558 в мембранах эритроцитов, тимуса, костном мозге и селезенке. Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии. III международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО. Москва, Дубна, 2007, с.64-65.
5. Симосян М.А., Симосян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобретения N341 Армпатента. Ереван, 1997.
6. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase, Ann. Rev.Biochem., 1995, 64, p.97-112.
7. Huang G., Chen Y., Lu H., Cao X. Coupling mitochondrial respiratory chain to cell death: an essential role of mitochondrial complex I in the interferon-beta and retinoic acid-induced cancer cell death, Cell. Death Differ., 2007, 14, p.327-337.
8. Kawanishi S., Inoue S. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species, Seikagaku, 1997, 68, p. 1014-1017.
9. Kim H.J., Oridate N., Lotan R. Increased level of the p47-phox subunit of NADPH oxidase by NADPH in head and neck squamous carcinoma cells, Int. J.Oncol., 2005, 27, p.787-790.
10. Kipiani V.A., Gambashidze K.G. et al. Changes in the pro-oxidant and anti-oxidant status of tissue during paraneoplastic processes, Bull. Exp. Biol. Med., 2000, 141, p.23-25.
11. Lee Y.S. Role of NADPH-oxidase-mediated generation of ROS in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in Hep G2 human hepatoma cells, Arch. Pharm. Res., 2005, 28, p.1183-1189.
12. Maltseva V.G. Dynamic analysis of modification of peripheral neutrophils functional activity and its regulation during

- tumor growth in vivo, *Tsitologiya*, 2006, 48, p.1000-1009.
13. *Moto M., Umemura T., Okamura M. et al.* Possible involvement of oxidative stress in dicyclonic-induced hepatocarcinogenesis in mice, *Arch. Toxicol.*, 2006, 80, p.694-702.
 14. *Paradiuk S., Renke J., Wozniak M., Korzon M.* Does chemotherapy and radiotherapy influence the level of oxidative stress in children with malignant bone tumours? *Med. Wieku. Rozwo J.*, 2006, 10, p.855-859.
 15. *Rohrdanz E., Kohl R.* Relation of antioxidant enzyme expression is response to hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 24, p.27-38.
 16. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* The reduction of ferrihemoglobin by erythrocytes membranes cytochrome b558III at various pathological states in vitro, *Electronic J. of Natural Sciences NAS RA*, 2006, 2, p.3-6.
 17. *Sohal R.S.* Mitochondria generate O_2^- and H_2O_2 , *FASEB J.*, 1997, 11, p.1269-1270.
 18. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, 59, p.1428-1459.
 19. *Wu W.S.* The signaling mechanism of reactive oxygen species in tumor progression, *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, 25, p.695-705.