

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

О.М. Філінська, С.В. Яблонська, Г.В. Островська,
В.К. Рибальченко

Київський національний університет ім.Тараса Шевченка

Вступ

Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка синтезовано похідне малеїміду - 1-(4-Cl-бензил)-3-хлоро-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) [12], що викликає пригнічуючу дію на низку протеїназ клітин людини. При дослідженні *in vitro* встановлено виражену антипроліферативну активність MI-1 на ракових культурах клітин людини, найбільшу активність на лініях клітин аденокарциноми товстого кишечника людини (SW-620) та на лініях клітин недрібноклітинного раку легень людини, що резистентні до дії інтерферону (A-549-R) [3]. MI-1 проявляє значний вплив і на трансформовані клітини, зокрема HEK-293 (лінія клітин нирки ембріона людини) та MCF7 (лінія клітин аденокарциноми молочної залози людини) [15]. Проте зараз в світі зареєстровано лише кілька подібних таргетних препаратів інгібіторів протеїназ, які є ефективними при певних онкологічних захворюваннях [9]. Значна частина розроблених інгібіторів не проходить всі стадії доклінічних та клінічних випробувань через виникнення резистентності при тривалому застосуванні, низьку ефективність, токсичність для організму та появу побічних ефектів. Одним із проявів пошкоджуючої дії ксенобіотиків є ураження клітин печінки та активація процесів вільнорадикального окислення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках науково-дослідної теми "Дослідження механізмів функціонування органів травного

тракту та розробка методів їх корекції" (№ державної реєстрації 0104U009878) Київського національного університету імені Тараса Шевченка як складової комплексної державної наукової програми "Здоров'я людини".

Метою досліджень було вивчення стану ферментів антиоксидантної системи - супероксиддисмутази (СОД) та каталази, процесів перекисного окислення ліпідів, окисної модифікації білків печінки щурів при дії похідного малеїміду - 1-(4-Cl-бензил)-3-хлоро-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон за умов розвитку оксидативного стресу, викликаного хлоридом кобальту (II).

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведені на білих щурах-самцях масою 200-300 г, що утримувалися у стандартних умовах віварію Київського національного університету. MI-1 (розчинений в соняшниковій олії) вводили тваринам перорально у дозі 5 мг/кг та хлорид кобальту (CoCl₂ · 6H₂O) - внутрішньочеревинно в дозі 15 мг/кг, що розчинений у 0,9 % NaCl. Введення проводили одноразово. Тварин було поділено на чотири групи, що отримували: №1 (контрольна) - соняшкову олію та 0,9 % NaCl, № 2 - MI-1 та 0,9 % NaCl; № 3 - CoCl₂ та соняшкову олію; № 4 - MI-1 та CoCl₂. MI-1 вводили за 2 години до введення хлориду кобальту. Тварин декапітували через 24 години після введення хлориду кобальту. В сироватці крові тварин визначали активність аланін-амінотрансферази (АлАТ) та аспартат-амінотрансферази (АсАТ) використовуючи стандартні набори реактивів "Фелісіт" (Україна). Цитозольну фракцію гепатоцитів печінки щурів виділяли за методом, що описаний [6]. Плазматичні мембрани (ПМ) гепатоцитів печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [14]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [11], ступінь спонтанного окислення білків - за методом Левіна [10] в модифікації [2]. Активність СОД та каталази визначали за [1, 5]. Інтенсивність ПОЛ визначали по вмісту малонового діальдегіду [5]. Статистичну обробку даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Отримані результати та їх обговорення

Встановлено, що MI-1 не викликає змін вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (МДА) після одноразового введення

ня, а хлорид кобальту незначно підвищує вміст даного показника. При сумісному застосуванні MI-1 та хлориду кобальта вміст МДА наближається до контрольних значень (рис. 1).

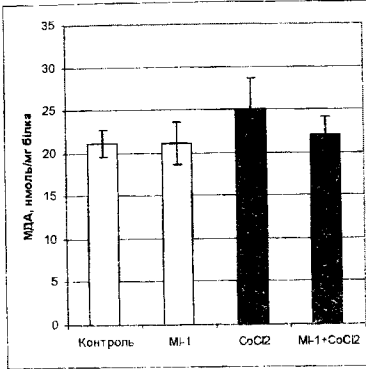


Рис. 1. Вміст малонового діальдегіду в плазматичних мембранах гепатоцитів при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні.

Окисна модифікація білків, викликана активними формами кисню, призводить до зміни конформації білків, що може мати вирішальне значення для каталітичної активності ферментів [8]. Деструкція білків є більш надійним маркером окислювальних пошкоджень тканин, ніж ПОЛ, оскільки продукти окислювальної модифікації білків більш стабільні, порівняно з пероксидним окисленням ліпідів [4]. При окисленні білків утворюються альдегідні та кетонні групи амінокислотних залишків (карбонільні групи), підвищений рівень яких є показником окислювального стресу. Встановлено, що при дії MI-1 та при сумісному застосуванні MI-1 та CoCl₂ вміст карбонільних груп білків в цитозолі не змінюється.

При дослідженні активності ключових ферментів антиоксидантного захисту - СОД і каталази, встановлено, що MI-1 викликає тенденцію до зниження активності СОД. Під впливом хлориду кобальту активність СОД знижується на 30% порівняно з контрольними значеннями. При сумісному застосуванні MI-1 та хлориду кобальту активність СОД не змінюється (рис. 2).

Під впливом MI-1 та при його сумісному застосуванні з хлоридом кобальту активність каталази практично не змінюється порівняно з контрольними значеннями (рис. 3), але ці дані невірогідні.

Пригнічення активності СОД хлоридом кобальту може бути наслідком утворення надлишку H₂O₂, зокрема, в результаті недостатньої дії каталази [7]. Активність СОД також пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і накопиченням токсичних перекисних продуктів (перекиси жирних кислот, альдегідів, кетонів тощо), які викликають зниження активності СОД та інших

антиоксидантних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази). Отже, зареєстроване нами зниження активності СОД під впливом CoCl₂, очевидно, обумовлено дією токсичних продуктів ПОЛ, яке значно інтенсифікується в печінці тварин (рис. 1). Проте, оскільки під впливом MI-1 вміст МДА, карбонільних груп та активність каталази не змінюється, то можна припустити, що в даному випадку пригнічення СОД обумовлено не дією токсичних перекисних продуктів, а іншими факторами. Відомо [13], що експресія Cu/Zn-СОД в умовах окислювального стресу знаходиться під регуляторним контролем сигнального кіназного каскаду PI3K/Akt, а він, в свою чергу, тісно пов'язаний з активацією низки мембранних кіназних рецепторів, зокрема інсулінового (INS-R) та рецептора інсуліноподібного фактору росту (IGF1-R), які, за нашими попередніми даними, блокуються мікромолярними концентраціями MI-1. Таке пригнічення вказаних рецепторів може бути однією з причин зниженої активності СОД при впливі MI-1.

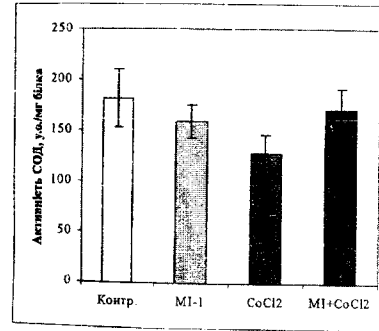


Рис. 2. Активність СОД при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні.

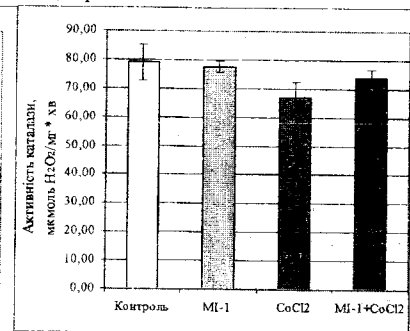


Рис. 3. Активність каталази при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні.

Одним із важливих критеріїв впровадження лікарського препарату в клінічну практику є відсутність високої токсичності препарату при тривалому введенні. Високочутливими показниками ушкодження та порушення функцій печінки є збільшення активності внутрішньоклітинних ферментів АлАТ та АсАТ.

Встановлено, що після одноразового інтрагастрального введення MI-1 спостерігається тенденція до незначного збільшення активності АлАТ та АсАТ в сироватці крові тварин (рис. 4).

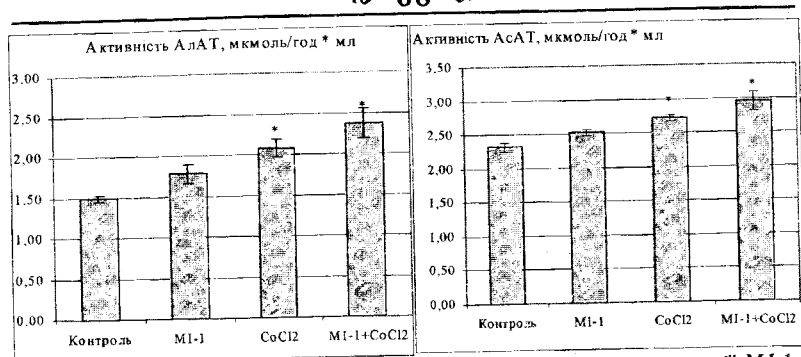


Рис. 4. Активність АлАТ та АсАТ в сироватці крові щурів при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні (*- р<0,01 порівняно з контролем).

При дії хлориду кобальту та його сумісному застосуванні з MI-1 активність ферментів збільшується: АлАТ на 60% і АсАТ на 30% порівняно з контрольними значеннями. Відсутність достовірного збільшення активності амінотрансфераз в сироватці під впливом новосинтезованого похідного малеїміду MI-1 свідчить, що він не викликає значних пошкодження печінки після одноразового введення. Хлорид кобальту при одноразовому введенні пошкоджує клітини печінки.

Висновки

1. MI-1 проявляє невисоку токсичність, незначно підвищуючи активність АлАТ та АсАТ печінки щурів.
2. За умов експериментального окисдативного стресу порушується прооксидантно-антиоксидантна рівновага у бік накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів (МДА) та окисної модифікації білків (КГ). MI-1 нормалізує вміст продуктів ПОЛ і окисної модифікації білків та сприяє відновленню активності ключових ферментів антиоксидантного захисту.

Література

1. Артюхов В.Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами / В.Г.Артюхов, М.А.Наквасина. - Воронеж : Изд. Воронежского гос. ун-та, 2000. - 296 с.
 2. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е.Е.Дубинина, М.Г.Морозова, Н.В.Леонова [и др.] // Вопросы медицинской химии - 2000
- Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

- Т. 46, № 4. - С. 398-409.

3. Дубиніна Г.Г. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-*R*-бензил)-3-*R*1-4-(*R*2-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону / Г.Г.Дубиніна, С.М.Головач, В.О. Козловський [и др.] // Журн. органіч. та фармацевтич. хімії.- 2007. - Т.5, № 1. - С. 39-49.

4. Дубиніна О.Ю. Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків / О.Ю. Дубиніна // Медична хімія. - 2001. - 3, № 2. - С. 5-12.

5. Метод определения активности каталазы / М.А.Королук, Л.И.Иванова, И.Г.Майорова [и др.] // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.

6. Методы биохимических исследований / под ред. М.И. Прохоровой. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. - 272 с.

7. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н.Б.Поберезкина, Л.Ф. Осинская // Український біохімічний журнал. -1989. - Т. 61, № 2.- С. 14-27.

8. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure / K.J.Davies, M.E. Delsignore // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 262. - P. 9908-9913.

9. In Silico design of protein kinase inhibitors: successes and failures / G.G.Dubinina, O.O.Chupryna, M.O.Platonov [e.a.] // Anticancer agents in medicinal chemistry. - 2007. - Vol. 7, № 2. - P. 171-188.

10. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L.Levine, D.Garland, C.N. Oliver [e.a.] // Method in enzymology. - 1990. - Vol. 186. - P.464-478.

11. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L. Farr [e.a.] // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193, № 1. - P. 265-275.

12. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / Dubinina G.G., Volovenko Yu.M. - № U200601855 ; decl. 21.02.2006 ; publ. 25.04.2007.

13. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kB / A.I.Rojo, M.Salinas, D.Martin [e.a.] // J. Neuroscience. - 2004. - Vol. 24(33) - P. 7324-7334.

14. Song C.S. Plasma membranes of the rat liver isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi / C.S. Song, W. Rubin, A.B. Rifkind // J. Cell Biol. - 1969. - Vol. 41, № 1. - P. 124-131.

15. Yablonska S. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate / S. Yablonska, O. Filinska, G. Ostrovska [e.a.] // The FEBS Journal "Biochemistry of cell regulation". - Vol. 275. - 2008. - P. 348.

Резюме

Філінська О.М., Яблонська С.В., Островська Г.В., Рыбальченко В.К. Стан антиоксидантної системи печінки щурів під впливом похідного малеїміду за умов розвитку оксидативного стресу.

Похідне малеїміду (MI-1)-1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-дион при одноразовому введенні не викликає змін вмісту МДА та окисної модифікації білків (карбонільні групи), а також активності каталази печінки щурів. MI-1 попереджає стимульовану хлоридом кобальту інтенсифікацію окисних процесів, нормалізуючи дані показники до контрольного рівня.

Ключові слова: похідне малеїміду, хлорид кобальту, оксидативний стрес, малоновий діальдегід, карбонільні групи, активність антиоксидантних ферментів.

Резюме

Филинская Е.М., Яблонская С.В., Островская Г.В., Рыбальченко В.К. Состояние антиоксидантной системы печени крыс при влиянии производного малеимида в условиях развития оксидативного стресса.

Производное малеимида (MI-1)-1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1H-пірол-2,5-дион при одноразовом введении не вызывает изменений содержания МДА и окислительной модификации белков (карбонильные группы), а также активности каталазы печени крыс. MI-1 предупреждает стимулированную хлоридом кобальта интенсификацию окислительных процессов, нормализуя данные показатели до контрольного уровня.

Ключевые слова: производное малеимида, хлорид кобальта, оксидативный стресс, малоновый диальдегид, карбонильные группы, активность антиоксидантных ферментов.

Summary

Filinska O.M., Yablonska S.V., Ostrovska G.V., Rybalchenko V.K. State of the antioxidant system under the influence of maleimide derivative in oxidative stress condition.

The maleimide derivative (MI-1) - 1-(4-Cl-benzy!) - 3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione does not cause changes in content of malonic dialdehyde and oxidatively modified proteins and catalase activity of rat liver. MI-1 prevents an intensification of the oxidative stress caused by cobalt chloride and recover of these parameters to control value.

Key words: maleimide derivative, cobalt chloride, oxidative stress, malonic dialdehyde, carbonyl groups, antioxidant enzyme activity.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.романюк

ЕКОЛОГІЧНА І КЛІНІЧНА ІМУНОЛОГІЯ ТА ІМУНОРЕАБІЛІТАЦІЯ