

УДК 546.719: 54.024:577.12:577.151:616-006.699

АНТИОКСИДАНТНА І ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ ДИКАРБОКСИЛАТІВ ДИРЕНІЮ У ТВАРИН ІЗ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

І. В. ЛЕУС¹, К. Л. ШАМЕЛАШВІЛІ¹, О. Д. СКОРИК¹, С. Ю. ТРЕТЯК²,
О. А. ГОЛІЧЕНКО², О. В. ШТЕМЕНКО², Н. І. ШТЕМЕНКО¹

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;

²Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпропетровськ;
e-mail: ingaleus@mail.ru

Вивчено антиоксидантну і протипухлинну активність дикарбоксилатів диренію цис- і транс-конфігурації з різними органічними лігандами на моделі пухлинного росту (карцинома Герена). Показано, що сполуки різної конфігурації виявляють подібний протипухлинний ефект, проте для цис-дикарбоксилатів диренію (ІІ) характерні значніший антиоксидантний ефект і ступінь активації еритроцитарної супероксиддисмутази (СОД). Вперше показано залежність між структурою дикарбоксилатів диренію (ІІ) та їхньою здатністю до активації еритроцитарної СОД у тварин із карциномою Герена. Дослідження *in vitro* показали, що сполуки ренію цис- і транс-конфігурації взаємодіють з еритроцитарною СОД і здійснюють подібну зміну вторинної структури протеїну. Для цис-дикарбоксилату диренію встановлено СОД-подібну активність, нехарактерну для транс-дикарбоксилату. Вивчені особливості взаємодії сполук ренію із СОД *in vitro* тільки частково пояснюють активацію СОД в експериментах *in vivo*. Зроблено спробу пояснити відмінності механізмів антиоксидантної активності цис- і транс- дикарбоксилатів диренію.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, ТБК-активні продукти, сполуки ренію з органічними лігандами, цисплатин, модель пухлинного росту, оксидативний стрес.

Процес розвитку пухлини супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги за участю активних форм кисню, що призводить до активації процесу пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантної системи (АОС), насамперед, супероксиддисмутази (СОД) в організмі пухлиноносіїв [1]. Супероксиддисмутаза (1.15.1.1) належить до найважливіших ензимів антиоксидантного захисту. Підтверджено той факт, що активність СОД пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і залежить від накопичення продуктів ПОЛ та від виду і гістогенезу пухлин, а також від стадії їхнього прогресування [2]. СОД разом з іншими компонентами АОС та ПОЛ забезпечують взаємодоповнюючу регуляцію вільнорадикального окислення, що спрямована на стабілізацію, насамперед, мембран еритроцитів [3].

Антиоксидантні властивості препаратів, у тому числі і протипухлинні, можуть відігравати вирішальну роль у кореляції патологічних станів [4]. Кластерні сполуки ренію мають унікальний реакційний центр — $Re\equiv Re$ з відновними властивостями. Ці сполуки виявляють низьку токсичність, антиоксидантні,

гепато- та нефропротекторні властивості на моделях гострого токсичного гепатиту та за канцерогенезу [5–7], стабілізують мембрани еритроцитів та коригують стан окисного стресу на цих моделях і на моделях гемолітичних анемії [8, 9]. Серед кластерних сполук ренію особливо цікавою групою є цис-дикарбоксилати диренію, які виявляють помірну протипухлинну активність у разі їхнього окремого введення (до 60% гальмування пухлинного росту) та високу протипухлинну активність (97–98% гальмування пухлинного росту) за введення їх у вигляді реній-платинової системи (система $Re-Pt$) [10,11]. Нещодавно синтезовані транс-дикарбоксилати диренію (ІІ) [12] раніше не досліджувалися на подібну біологічну дію. Проте було отримано дані про їхню надзвичайно високу реакційну здатність у реакції зі штучними гальвіноксильним та 1,3,5-трифенілвердазильним радикалами (у 700 разів більшу ніж виявляють цис-сполуки) [13] та показано різний вплив сполук цис- і транс-ряду на вторинну структуру гомологічних сироваткових альбумінів [14]. Отже, актуальною постає задача визначити антиоксидантні властивості кластерних

сполук ренію на моделі пухлинного росту та визначити, чи реалізується залежність структура – антирадикальна активність в антиоксидантних властивостях ренієвих сполук *in vivo*.

Відомо металоорганічні сполуки із супероксиддисмутазною активністю, яка виявляється, зокрема, у ксантин–ксантиноксидазній ензиматичній системі [15–17]. Таким чином, актуальним питанням є з'ясувати можливість сполук ренію виявляти СОД-подібну активність або безпосередній вплив їх на активність ензиму *in vitro*. Вивчення взаємодії протеїнових молекул із металоорганічними сполуками *in vitro* має окреме значення, оскільки висвітлює шляхи створення кон'югатів – синтетичних протеїнів, які вже використовуються в практиці [18].

Отже, метою роботи було вивчення антиоксидантних властивостей дикарбоксилатів диренію (III) *цис*- і *транс*-конфігурації на моделі онкогенезу за їх окремого введення та введення у складі системи Re–Pt, вплив їх на активність СОД у цих експериментах, а також дослідження *in vitro* взаємодії молекул СОД зі сполуками ренію у ксантин–ксантиноксидазній ензиматичній системі.

Матеріали і методи

У роботі досліджувалися кластерні сполуки диренію (III) з органічними лігандами, синтезовані в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії в ліпосомних (lip, розміром

1–5 мкм) і наноліпосомних (nl, розміром 50–150 нм) формах, які виготовлялися за методами, що наведено в [11, 19]. За просторовою структурою та складом досліджувані сполуки належать до двох структурних типів (рис. 1).

У роботі використано 320 щурів популяції Wistar з масою тіла 100–120 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Експерименти на тваринах здійснювали відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, використаних в експериментальних та інших наукових цілях». Пухлинний ріст моделювали шляхом трансплантації здоровим щурам 20%-ї суспензії клітин карциноми Герена (Т8) у фізіологічному розчині (0,9%-й NaCl) [20]. Донорами ракових клітин були пухлиноносії, отримані з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України безпосередньо перед трансплантацією. Тварин було поділено на групи (по 10 щурів у кожній): інтактні тварини (контроль); щури, яким трансплантували карциному Герена (Т8); щури-пухлиноносії, яким вводили цисплатин (cisPt): одноразове введення розчину cisPt у дозі 8 мг/кг [21]; щури-пухлиноносії, яким вводили сполуки ренію за схемою антиоксидантної терапії в дозі 7 мкмоль/кг з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби (спосіб 1) [22]; щури-пухлиноносії, яким вводили систему Re–Pt: одноразове введення розчину cisPt у дозі 8 мг/кг на 9 добу та сполук ренію у ліпосомній або наноліпосомній формі, починаючи з 3-ї доби після трансплантації

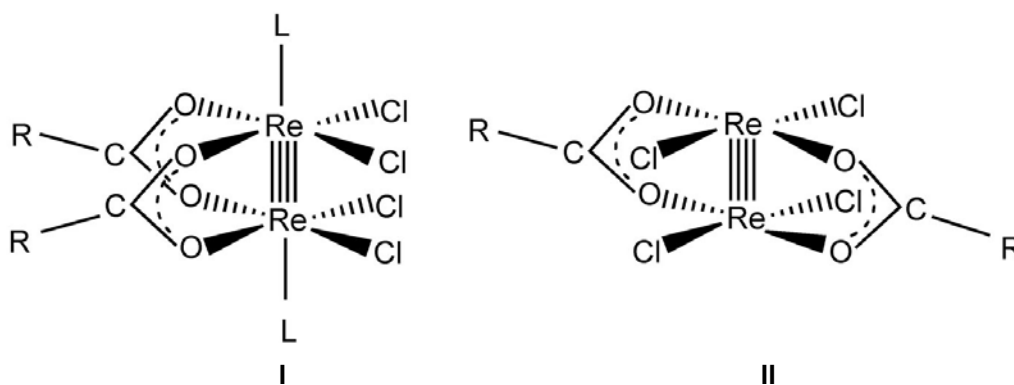


Рис. 1. Типи досліджуваних комплексних сполук ренію з органічними лігандами: I – *цис*-дикарбоксилати: $\text{cis-Re}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cl}_4$ – *цис*-тетрахлороди- μ -ацетатодиреній (III) ($\text{Re}_{\text{cis-acet}}$), $\text{cis-Re}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})_2\text{Cl}_4$ – *цис*-тетрахлороди- μ -пропіонатодиреній (III) ($\text{Re}_{\text{cis-prop}}$), $\text{cis-Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_2\text{Cl}_4$ – *цис*-тетрахлороди- μ -ізобутиратодиреній (III) ($\text{Re}_{\text{cis-isob}}$), $\text{cis-Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4$ – *цис*-тетрахлороди- μ -півалатодиреній (III) – ($\text{Re}_{\text{cis-piv}}$); II – *транс*-дикарбоксилати: $\text{trans-Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_2\text{Cl}_4$ – *транс*-тетрахлороди- μ -ізобутиратодиреній (III) ($\text{Re}_{\text{trans-isob}}$), $\text{trans-Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4$ – *транс*-тетрахлороди- μ -півалатодиреній (III) ($\text{Re}_{\text{trans-piv}}$); R – органічні ліганди (CH_3^- , C_2H_5^- , $\text{i-C}_3\text{H}_7^-$, $(\text{CH}_3)_3\text{C}^-$); L – CH_3CN , H_2O , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$

ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби, у дозі 7 мкмоль/кг з кінцевим молярним співвідношенням введених сполук ренію і платини 4 : 1 (cisPt+Re) за схемою антиоксидантної терапії (спосіб 2) [23]. Для сполук ренію терапевтичну дозу було підібрано експериментальним шляхом у низці досліджень *in vitro* та *in vivo* [8–10] з урахуванням їхньої низької токсичності [24]. На 21-й день після трансплантації пухлини проводили декапітацію щурів під ефірним наркозом, зважували залишкову видалену пухлину та досліджували вміст ТБК-активних продуктів (ТБК – тіобарбітурова кислота) у плазмі крові [25], а активність СОД – в еритроцитах [26].

Дослідження вторинної структури комплексу СОД зі сполуками ренію проводили на спектрометрі AVIV 202-01 Circular Dichroism з використанням кварцевих кювет (1 см). Концентрація СОД (Sigma-Aldrich, США), в експерименті дорівнювала 0,056 мг/мл. Досліджували вплив сполуки $Re_{cis-isob}$ та $Re_{trans-isob}$ в молярному співвідношенні 1 : 10 до СОД одразу після додавання їх до протеїну у фосфатному буфері (рН 7,4). Розрахунок вторинної структури проводили за [27, 28]. Кожен вимір робили впродовж 10 хв у триразовому повторенні та представляли як середнє значення з урахуванням стандартного відхилення.

Активність СОД у присутності сполук ренію ($Re_{cis-isob}$, $Re_{trans-isob}$) та їхню СОД-подібну активність *in vitro* визначали за використання ксантин-ксантинооксидазної системи [15], що входить до набору для визначення активності 19160 SOD (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Внаслідок взаємодії супероксид-аніона з WST-1 (2-(4-йодофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дисульфофеніл)-2Н-тетразоліум, моноосновна сіль) утворюється формазан, що має інтенсивний жовтий колір, який можна фіксувати спектрофотометрично. Зменшення кількості $\cdot O_2^-$ за рахунок активності СОД або СОД-подібних речовин знижує утворення WST-1 формазану. Вимірювання проводилися при кімнатній температурі (25 °С) на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1601 UV-visible при 440 нм кожну хвилину протягом 5 хв після додавання розчину ксантин-оксидази. Експериментально було підібрано концентрацію СОД (0,03 У/мг протеїну), за якої відбувалося 50%-е інгібування утворення WST-1 формазану. Концентрацію сполук ренію розраховували з урахуванням молекулярної ваги сполук та СОД у співвідношенні 1 : 10 (СОД : Re).

Результати обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента. Зміни показників вважалися вірогідними при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Експериментально встановлено, що у групі, де щури з трансплантованою карциномою Герена не отримували впливу будь-яких препаратів, спостерігалось значне підвищення (більш ніж у 5 разів) концентрації ТБК-активних продуктів у плазмі крові, що свідчить про інтенсифікацію процесу ПОЛ та низьку ефективність роботи системи антиоксидантного захисту (АОЗ) (табл. 1).

Введення сполук ренію *цис*-конфігурації щурам-пухлиноносіям виявляє помірний протипухлинний ефект – гальмування розвитку пухлини становить 12,94–39,75% за введення ліпосомних форм і до 52,71% за введення наноліпосом. Встановлено, що структура органічного ліганду в молекулі *цис*-дикарбоксилатів впливає на протипухлинні властивості кластерних сполук ренію, тобто зі збільшенням величини алкільного радикала зростає протипухлинна активність сполуки; проте збільшення довжини радикала є доцільним тільки до певної довжини – C4 і є максимально ефективним для ізобутиратного ліганду за введення сполук у ліпосомній формі. Окреме введення *цис*- і *транс*-дикарбоксилатів диренію в наноліпосомних формах не має значних відмінностей у впливі на розвиток пухлини.

Введення сполук ренію *цис*-ряду знижує рівень ТБК-активних продуктів на 13–43% порівняно з групою Т8. Найзначніше зниження концентрації ТБК-активних продуктів спостерігається у разі введення сполуки $Re_{cis-isoblip}$. За окремого введення (1-й спосіб) сполуки з півалатними і ізобутиратними лігандами *цис*- і *транс*-конфігурації не різняться щодо гальмування інтенсивності ПОЛ. Тобто усі досліджувані кластерні сполуки ренію виявляють антиоксидантні властивості *in vivo*, підтверджуючи досліди *in vitro* [29], що доводить провідну роль почверного зв'язку у феномені антиоксидантної дії незалежно від просторового розташування лігандів.

У щурів із карциномою Герена активність СОД в еритроцитах підвищується на 41,7% порівняно з контрольними значеннями, що свідчить про активацію ензиматичної ланки захисної антиоксидантної системи [1, 3]. Підвищення активності СОД в еритроцитах за введення сполук ренію досягає 285% порівняно

Таблиця 1. Показники оксидативного стресу за окремого введення сполук ренію, (1-й спосіб введення), $n = 10$

Групи	Гальмування розвитку пухлини, %	Вміст ТБК-активних продуктів, мкмоль/л	Активність СОД в еритроцитах, од./1 млн. еритроцитів
1. Контроль	—	4,19 ± 0,38	124,7 ± 5,2
2. T8	0,00	22,18 ± 2,64 [#]	176,7 ± 6,6 [#]
3. Re cis-acet, lip	12,94 ± 2,31	19,32 ± 1,01	402,50 ± 11,74 ^{**}
4. Re cis-prop, lip	16,61 ± 1,95	13,08 ± 2,12 [*]	421,30 ± 10,83 ^{**}
5. Re cis-isob, lip	39,75 ± 3,65 [*]	12,73 ± 1,16 [*]	437,20 ± 13,02 ^{**}
6. Re cis-piv, lip	35,36 ± 3,51 [*]	12,91 ± 0,95 [*]	480,10 ± 12,31 ^{**}
7. Re cis-isob, nl	50,61 ± 3,78 [*]	18,31 ± 2,87	432,2 ± 10,1 ^{**}
8. Re cis-piv, nl	52,71 ± 2,53 [*]	17,37 ± 1,36	465,40 ± 12,24 ^{**}
Середнє 3–8	34,66 ± 2,96	15,62 ± 1,58	439,78 ± 11,71
9. Re trans-isob, nl	48,24 ± 2,41 [*]	18,21 ± 1,21	301,10 ± 7,48 [*]
10. Re trans-piv, nl	49,15 ± 3,12 [*]	18,27 ± 0,91	307,20 ± 6,98 [*]
Середнє 9–10	48,7 ± 2,77	18,24 ± 1,06	304,15 ± 7,23

Тут і в табл. 2: [#] $P < 0,05$ відносно контрольної групи; ^{*} $P < 0,05$ відносно групи T8; ^{**} $P < 0,01$; ^{***} $P < 0,001$

з контрольною групою, що не має аналогів у відомих нам джерелах літератури. При цьому зі зростанням довжини органічного ліганду в ряду *цис*-дикарбоксилатів диренію (III) активність еритроцитарної СОД збільшується односпрямовано порівняно з групою T8:

$$\text{Re}_{\text{cis-acet}} (127,8\%) < \text{Re}_{\text{cis-prop}} (138,4\%) < \\ < \text{Re}_{\text{cis-isob}} (147,4\%) < \text{Re}_{\text{cis-piv}} (171,7\%).$$

Отже, можна припустити, що сполуки ренію впливають на еритроцитарну СОД, і довжина ліганду (гідрофобність сполуки ренію) впливає на цей процес.

Транс-дикарбоксилати теж збільшують активність СОД в еритроцитах шурів – на 70–72% порівняно з групою T8, але не так значно, як *цис*-дикарбоксилати диренію. Таким чином, зафіксовано більш значний вплив на активність еритроцитарної СОД у 1,5 раза ($P < 0,01$) сполук ренію *цис*-конфігурації, ніж *транс*-конфігурації.

За введення комплексних сполук ренію у системі Re–Pt (2-й спосіб), на відміну від експериментів, обговорених вище, спостерігається значне гальмування розвитку пухлини (табл. 2).

У 20–30% випадків спостерігається повна редукція карциноми у досліджуваних шурів, що узгоджується з раніше описаними експериментами з дослідження протипухлинної системи Re–Pt [11, 23]. Введення системи Re–Pt призводить до зниження концентрації ТБК-

активних продуктів у 2–5 разів порівняно з групою шурів-пухлиноносіїв. Слід зазначити, що за введення систем з *транс*-дикарбоксилатами вміст ТБК-активних продуктів у крові шурів менше лише на 10% порівняно із групою T8. Така досить незначна різниця свідчить про можливо меншу ефективність системи з використанням *транс*-дикарбоксилатів на цей показник або її відсутність. Отже, антирадикальні властивості сполук ренію не залежать від форми введення та природи органічного ліганду, але на ці властивості впливає просторове розташування лігандів навколо почверного зв'язку.

Виявлено значну кореляційну залежність між вмістом ТБК-активних продуктів та здатністю до гальмування пухлин ($r = +0,81$). Це свідчить про можливість використання цього показника для моніторингу ефективності протипухлинної терапії.

Введення системи Re–Pt, як і за окремого введення сполук ренію, приводить до підвищення активності СОД порівняно із групою T8 приблизно на такому самому рівні. Для сполук ренію у складі Re–Pt системи (2-й спосіб) також показана залежність збільшення активності еритроцитарної СОД зі зростанням довжини алкільного радикала сполуки ренію:

$$\text{Re}_{\text{cis-acet}} (85,3\%) < \text{Re}_{\text{cis-prop}} (94,5\%) < \\ < \text{Re}_{\text{cis-isob}} (101,8\%) < \text{Re}_{\text{cis-piv}} (175,7\%).$$

Таблиця 2. Показники оксидативного стресу за введення системи Re–Pt (2-й спосіб), n = 10

Групи	Гальмування розвитку пухлини, %	Вміст ТБК-активних продуктів, мкмоль/л	Активність СОД в еритроцитах, од./1 млн. еритроцитів
Контроль	–	4,19 ± 0,38	124,7 ± 5,2
1.Т8	–	22,18 ± 2,64 [#]	176,71 ± 6,64 [#]
2. cisPt	71,99 ± 3,60	21,16 ± 1,06	363,51 ± 7,52 ^{**}
3. cisPt+Re cis-acet, lip	78,22 ± 3,72	12,42 ± 1,83 [*]	327,54 ± 7,41 ^{**}
4. cisPt+Re cis-prop, lip	97,63 ± 5,05	5,81 ± 0,87 ^{**}	343,68 ± 9,72 ^{**}
5. cisPt+Re cis-isob, lip	99,56 ± 4,93	4,34 ± 0,67 ^{**}	356,6 ± 5,83 ^{**}
6. cisPt+Re cis-piv, lip	99,91 ± 5,99	6,83 ± 1,02 ^{**}	487,13 ± 10,29 ^{***}
7. cisPt+Re cis-isob, nl	99,10 ± 4,95	14,42 ± 1,13 [*]	351,24 ± 8,46 ^{**}
8. cisPt+Re cis-piv, nl	99,14 ± 5,76	15,32 ± 1,22 [*]	369,72 ± 10,87 ^{**}
Середнє 3–8	95,59 ± 5,07	9,86 ± 1,04	372,62 ± 8,75
9. cisPt+Re trans-isob, nl	99,56 ± 4,97	20,24 ± 1,81	230,33 ± 7,72 [*]
10. cisPt+Re trans-piv, nl	98,18 ± 5,08	20,19 ± 1,29	223,84 ± 8,94 [*]
Середнє 9–10	98,87 ± 5,03	20,22 ± 1,55	227,05 ± 8,32

За введення систем із *транс*-дикарбоксилатами активність СОД збільшується лише на 28,5–30,3% порівняно з групою Т8. Отже, з огляду на ці дані, можна припустити, зокрема, що *цис*- та *транс*-ізомери сполук ренію по-різному взаємодіють з еритроцитарною СОД, впливаючи на її активність.

Ми припускаємо можливий механізм антиоксидантної дії кластерних сполук ренію у двох різних експериментах (без і з cisPt) залежно від інтенсивності ПОЛ, який ґрунтується на положенні – почверний зв'язок Re–Re є пасткою для радикалів [30] – та на експериментальних фактах, де показано, що кластерні сполуки ренію взаємодіють із радикалами з різною швидкістю залежно від природи та розташування органічного ліганду [23]. Вірогідно в експериментах, де відсутній cisPt і продукція радикалів нижча, краще спрацьовують швидкі пастки для радикалів (*транс*-дикарбоксилати); і, навпаки: у присутності прооксиданта cisPt, коли інтенсивність ПОЛ досягає максимальних значень, повільні пастки для радикалів є ефективнішими (*цис*-дикарбоксилати). Одержані результати можуть бути корисними для індивідуальної медицини майбутнього, коли лікують не за загальноприйнятою схемою, а враховують індивідуальний редокс-статус пацієнта [31]. Щодо унікальної здатності сполук ренію активувати еритроцитарну СОД – у попередніх дослідах нашої лабораторії пока-

зано здатність ренієвих сполук взаємодіяти із протеїнами [9, 12]. Отже, враховуючи той факт, що сполуки ренію присутні в еритроцитах щурів у концентрації 0,5–1,0 мкг/г [10], вони можуть зв'язуватися з еритроцитарною СОД, впливаючи на її активність.

Вищезазначена залежність активації СОД від структури сполук ренію є також ґрунтовною основою для здійснення модельних експериментів із нативною еритроцитарною СОД та для з'ясування питання про безпосередній вплив сполук ренію на конформацію молекули і активність СОД *in vitro*.

Вивчення спектрів кругового дихроїзму (КД) в експерименті *in vitro* показало, що за дії сполук ренію *цис*- та *транс*-конфігурації відбуваються певні односпрямовані зміни вторинної структури молекули СОД (рис. 2).

Молярна еліптичність СОД у присутності $Re_{cis-isob}$ та $Re_{trans-isob}$ змінюється, відбувається зсув у короткохвильову область і зниження позитивного максимуму, що свідчить про зниження β-конформації і підвищення неупорядкованості структури молекули. Це підтверджується даними розрахунку вторинної структури протеїну (табл. 3).

$Re_{cis-isob}$ і $Re_{trans-isob}$ практично однаково змінюють вміст елементів вторинної структури ензиму: на 6–7% збільшують α-спіралізовані ділянки та на 12–13% нерегулярну структуру і зменшують відсоток β-шарів на 16–18%

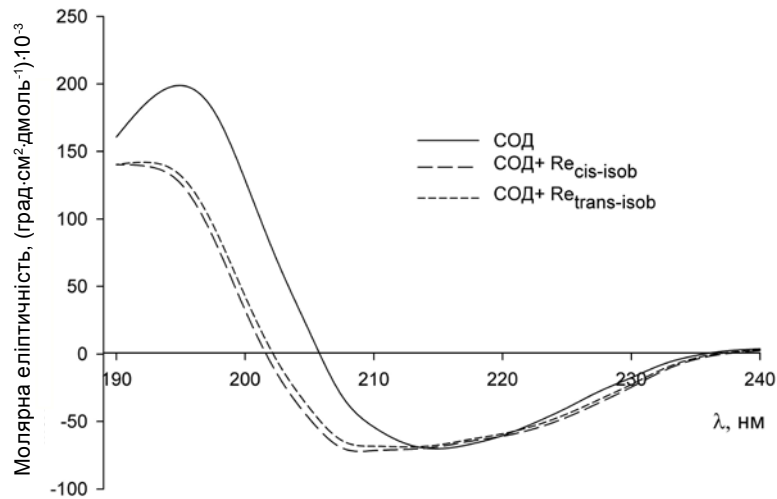


Рис. 2. Молярна еліптичність СОД, СОД + $Re_{cis-isob}$ та СОД + $Re_{trans-isob}$ в молярному співвідношенні 1 : 10

та β -вигинів на 1–3%. Подібні зміни було відмічено за взаємодії $Re_{cis-isob}$ з бичачим сироватковим альбуміном [12]. Із джерел літератури відомо, що подібні зміни вторинної структури можуть призводити до зміни активності СОД [32]. Чи впливають ці зміни на активний центр ензиму було з'ясовано у подальших експериментах, наведених нижче.

Як зазначено в розділі статті «Матеріали і методи» дослідження активності СОД, комплексів СОД зі сполуками ренію і наявності СОД-подібної активності *цис*- і *транс*-дикарбоксилатів диренію проводилося *in vitro* на ксантин–ксантинооксидазній системі, яка здійснює утворення супероксидного аніона в реакції ксантинооксидази із ксантином. Якщо додавати до цієї системи СОД, потім СОД із сполуками ренію у співвідношенні 1 : 10 і вимірювати зміну інтенсивності поглинання в області 440 нм з часом, то присутність кластерних сполук ренію незначно впливає на активність ензиму (табл. 4).

Проте слід звернути увагу на дані зміни абсорбції у ксантинооксидазній системі за перші хвилини експерименту, де $Re_{cis-isob}$ значно інгібує (на 76,74%) активність СОД, а $Re_{trans-isob}$ активує супероксиддисмутазну реакцію (на 6,98%) порівняно з ензимом. На останніх хвилинах експерименту активність СОД змінюється менше під впливом обох досліджуваних сполук, і меншою стає різниця у впливі на активність між *цис*- і *транс*-сполуками. Під впливом сполук ренію змінюється конформація протеїну і стає подібною до впливу *цис*- і *транс*-ізобутиратних сполук на конформацію СОД, що підтверджують дослідження спектрів КД, відповідно змінюється і ензиматична активність. Одержані дані свідчать про те, що сполуки ренію приєднуються до молекули СОД на значній відстані від активного центру, оскільки активність СОД змінюється в процесі утворення комплексів через 5 хв у середньому всього на 6–12%. Таким чином, ми вважаємо, що введення сполук ренію не може безпосеред-

Таблиця 3. Елементи вторинної структури (%) нативного СОД та комплексів СОД з $Re_{cis-isob}$ і $Re_{trans-isob}$ у співвідношенні 1 : 10 ($M \pm m$, $n = 3$)

Конформація	СОД	СОД+ $Re_{cis-isob}$	СОД+ $Re_{trans-isob}$
α -спіраль	7,22 \pm 1,21	14,52 \pm 1,99 (+ 7,3%)	13,42 \pm 2,02 (+ 6,2%)
β -шар	49,13 \pm 4,23	31,26 \pm 3,17 (- 17,87%)	32,88 \pm 5,17 (- 16,25%)
β -поворот	20,81 \pm 2,83	18,24 \pm 2,72 (- 2,57%)	18,95 \pm 1,89 (- 1,86%)
Нерегулярна структура	22,94 \pm 2,91	36,12 \pm 3,93 (+ 13,18%)	34,92 \pm 4,21 (+ 11,98%)

У дужках наведено збільшення (+) або зменшення (-) долі певного елемента вторинної структури протеїнів.

Таблиця 4. Швидкість зміни абсорбції ($A \cdot 10^{-2}$) СОД та комплексів СОД з $Re_{cis-isob}$ і $Re_{trans-isob}$ у співвідношенні 1 : 10 у ксантин–ксантинооксидазній системі ($M \pm m, n = 3$)

Час, хв	СОД	СОД+ $Re_{cis-isob}$	СОД+ $Re_{trans-isob}$
1	4,34 ± 0,25	1,04 ± 0,13	4,62 ± 0,21
2	10,42 ± 0,61	7,61 ± 0,43	11,43 ± 1,14
3	16,40 ± 0,93	14,42 ± 1,21	18,15 ± 1,12
4	22,21 ± 1,86	20,15 ± 1,32	24,63 ± 2,36
5	27,77 ± 2,48	25,20 ± 3,14	30,90 ± 3,92

Таблиця 5. Швидкість зміни абсорбції ($A \cdot 10^{-2}$) СОД та $Re_{cis-isob}$ і $Re_{trans-isob}$ у ксантин–ксантинооксидазній системі ($M \pm m, n = 3$)

Час, хв	СОД	$Re_{cis-isob}$	$Re_{trans-isob}$
1	4,34 ± 0,25	2,16 ± 0,51	15,67 ± 1,13
2	10,42 ± 0,61	13,15 ± 1,42	20,55 ± 2,14
3	16,40 ± 0,93	22,63 ± 2,14	29,91 ± 2,33

ньо істотно впливати на рівень активності ензиму шляхом взаємодії з молекулою протеїну за їх застосування як терапевтичного агента на моделі пухлинного росту.

Оскільки нами не знайдено безпосереднього впливу досліджуваних сполук на активний центр СОД, то ми зробили припущення, що значне підвищення активності ензиму в експерименті *in vivo* можливе за рахунок СОД-подібної активності самих кластерних сполук ренію, яку вивчали на тій самій системі, проте СОД і сполуки ренію вводили окремо. У табл. 5 показано відносну інтенсивність забарвлення у разі внесення сполук ренію і СОД в однаковій концентрації – $1,7 \cdot 10^{-6}$ М.

За додавання до ксантинооксидазної системи $Re_{cis-isob}$ на 1-й хвилині експерименту абсорбція нижче на 50,23%, що може свідчити про значну СОД-подібну активність цієї сполуки. У 2-у хвилину йде потужна активація ксантинооксидазної системи, і далі інтенсивність абсорбції у присутності *цис*-дикарбоксилатної сполуки ренію не відрізняється від окислення ксантинооксидазою субстрату без впливу будь-яких чинників. Це свідчить про наявність СОД-подібної активності у $Re_{cis-isob}$ на початку експерименту. *Цис*-дикарбоксилатна сполука ренію виявляє більш значну СОД-подібну активність, ніж комплекси міді [15], оскільки вже при концентрації $1,7 \cdot 10^{-6}$ М виявляє більше ніж 50%-е інгібування ксантин–ксантинооксидазної системи, що перевершує результати нативної СОД.

$Re_{trans-isob}$, на відміну від $Re_{cis-isob}$, взагалі не виявляє СОД-подібну дію на ксантинооксидазній системі. Додавання цієї сполуки ренію підвищує інтенсивність абсорбції в ксантинооксидазній системі на 261% на початку експерименту і далі зберігається на високому рівні. Така відмінність у реагуванні сполук ренію різної конфігурації може здійснювати певний внесок у процес активації СОД в експериментах *in vivo*.

Поясненням того, що $Re_{cis-isob}$ виявляє СОД-подібну активність на перших хвилинах, а $Re_{trans-isob}$ таку активність не проявляє, може бути наступне: сполуки *транс*-дикарбоксилатного типу є дуже реакційноздатними і реагують із вільним штучним радикалом за 9 секунд [13]. Реакція із супероксиданіоном можлива згідно зі схемою (рис. 3).

Координація вільного радикала відбувається у вільне аксіальне положення. Потім, після утворення нестійкого і дуже реакційноздатного радикала, відбувається його взаємодія з наступним радикалом. Оскільки *транс*-дикарбоксилати є унікальними швидкими пастками для радикалів, то, на нашу думку, відбувається невибіркова реакція з будь-яким компонентом ксантинооксидазної реакції, який утворюється раніше супероксиданіона.

Внаслідок наявності аксіального замісника для *цис*-дикарбоксилатів потрібна ще одна додаткова порівняно з *транс*-дикарбоксилатами реакція – заміщення аксіального замісника. Далі процес відбувається за тією самою

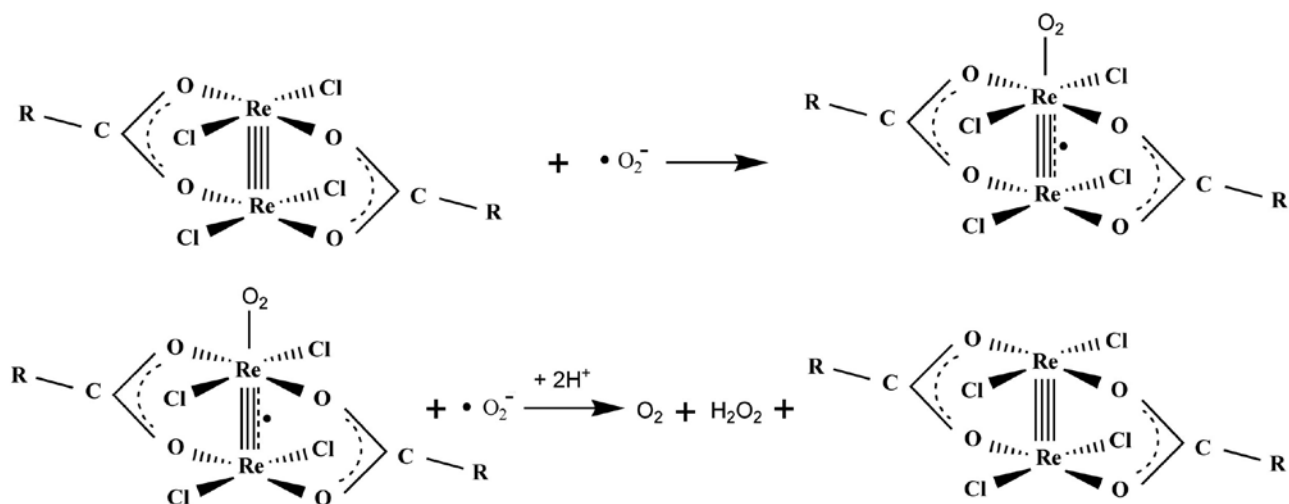


Рис. 3. Схема реакції транс-дикарбоксилатів із супероксиданіоном

послідовністю, що і для транс-дикарбоксилатів. Вірогідно, що наявність саме цієї додаткової стадії обумовлює те, що цис-дикарбоксилати належить до помірних за швидкістю радикальних пасток. Саме така помірність в окисдаційній реакції дає можливість вловити супероксиданіон на перших стадіях реакції.

АНТИОКСИДАНТНА І ПРОТИВООПУХОЛЕВА АКТИВНІСТЬ ДИКАРБОКСИЛАТОВ ДИРЕНІЯ У ЖИВОТНИХ С КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

І. В. Леус¹, К. Л. Шамелашвілі¹,
Е. Д. Скорик¹, С. Ю. Третьяк²,
А. А. Голиченко², А. В. Штеменко²,
Н. І. Штеменко¹

¹Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Украина;

²Государственное высшее учебное заведение «Украинский государственный химико-технологический университет», Днепропетровск; e-mail: ingaleus@mail.ru

Изучены антиоксидантные и противоопухолевые свойства дикарбоксилатов дирения цис- и транс-конфигурации с различными органическими лигандами на модели опухоле-

вого роста (карцинома Герена). Показано, что соединения разной конфигурации имеют почти одинаковый противоопухолевый эффект. Для цис-дикарбоксилатов дирения (III) характерны более значительный антиоксидантный эффект и степень активации эритроцитарной супероксиддисмутазы (СОД). Впервые показана зависимость способности к активации эритроцитарной СОД у животных с карциномой Герена от структуры дикарбоксилатов дирения (III). Исследования *in vitro* показали, что соединения рения цис- и транс-конфигурации взаимодействуют с эритроцитарной СОД и осуществляют подобные изменения вторичной структуры протеина. Для цис-дикарбоксилата установлена СОД-подобная активность, нехарактерная для транс-дикарбоксилата. Изученные особенности взаимодействия соединений рения с СОД *in vitro* только частично объясняют активацию СОД в экспериментах *in vivo*. Сделана попытка объяснить отличия механизма антиоксидантной активности цис- и транс-дикарбоксилатов дирения.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, ТБК-активные продукты, соединения рения с органическими лигандами, цисплатин, модель опухолевого роста, окисдаційний стресс.

**ANTIOXIDANT AND ANTITUMOR
ACTIVITY OF DIRHENIUM
DICARBOXYLATES IN ANIMALS
WITH GUERIN CARCINOMA**

*I. V. Leus¹, K. L. Shamelashvili¹,
O. D. Skorik¹, S. Y. Tretyak²,
O. A. Golichenko², O. V. Shtemenko²,
N. I. Shtemenko¹*

¹Oles Gonchar Dnipropetrovsk
National University, Ukraine;

²Ukrainian State University of Chemical
Technology, Dnipropetrovsk;
e-mail: ingaleus@mail.ru

S u m m a r y

The antioxidant and anticancer properties of dirhenium dicarboxylates of cis- and trans-configuration with different organic ligands in a model of tumor growth (Guerin carcinoma) were studied. It was shown that compounds of different configuration had similar antitumor effect, and dirhenium (III) cis-dicarboxylates were characterized by higher antioxidant activity and degree of activation of erythrocyte superoxide dismutase (SOD) in comparison with trans-isomers. The dependence between the structure of dirhenium (III) dicarboxylates and their ability to activate erythrocyte SOD in the model of tumor growth was shown for the first time. The *in vitro* studies have shown that rhenium compounds of cis- and trans-configuration interacted similarly with erythrocyte SOD, changing the protein secondary structure. In contrast to trans-dicarboxylate, for cis-dicarboxylate the SOD-like activity was demonstrated to be on the first minutes of the xantine-oxidase reaction. The studied features of the interaction between rhenium compounds and SOD *in vitro* explain only partly the activation of SOD in experiments *in vivo*. The attempt is made to explain the differences in the mechanisms of antioxidant activity of dirhenium cis- and trans-dicarboxylates.

Key words: superoxide dismutase, TBA-active products, rhenium compounds with organic ligands, cisplatin, model of tumor growth, oxidative stress.

1. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – **39**. – P 44–84.
2. Переводчикова Н. И. Противоопухолевая химиотерапия. – М: Медицина, 1993. – 224 с.
3. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. // Укр. биохим. журн. – 1989. – **61**, № 2 – С. 14–27.
4. Wondrak G. T. // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – **11**. – P. 3013–3069.

5. Івчук В. В., Полішко Т. М., Голіченко О. А. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 3. – С.76–84.
6. Івчук В. В., Полішко Т. М., Сорочан О. О. та ін. // Медична хімія. – 2009. – **11**. – С. 60–64.
7. Бабій С. О., Дьомшина О. О., Трушенко О. С., Штеменко Н. І. // Вісн. пробл. біол і мед. – 2010. – **3**. – С. 94–101.
8. Зеленьок М. А. Біологічна активність ліпосомних форм комплексних сполук ренію (III) з органічними лігандами. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2005. – 20 с.
9. Пірожкова-Паталах І. В. Антиоксидантна та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2001. – 20 с.
10. Скорик О. Д. Інтенсивність оксидативного стресу та склад вільних амінокислот крові при гальмуванні росту карциноми Герена сполуками ренію: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2009. – 20с.
11. Shtemenko A. V., Collery P., Shtemenko N. I. et al. // Dalton Trans. – 2009. – **26**. – P. 5132–5136.
12. Голиченко А. А., Штеменко А. В. // Коорд. химия. – 2006.– **4**.– С. 252–260.
13. Третьак С. Ю., Голиченко А. А., Штеменко А. В. // Вопр. химии и хим. технологии. – 2010. – **6**. – С. 92–97.
14. Леус І. В., Кленіна І. А., Заблоцька К. А. та ін. // Biopolymers and Cell. – 2011. – **27**, N 6. – P. 15–20.
15. Gonzalez-Alvarez M., Alzuet G., Borrás J. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. – 2003. – **8**. – P. 112–120.
16. Riley D. P. // Chem. Rev. – 1999. – **99**. – P. 2573–2588.
17. Zhang C. X., Lippard S. J. // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2003. – **7**. – P. 481–489.
18. Sakhno L. A., Sarnatskaya V. V. et al. // Exp. Oncol. – 2005. – **28**. – P. 303–307.
19. Егорова Д. Е., Штеменко А. В. // Вопр. химии и хим. технологии. – 2010. – **1**. – С. 103–110.
20. Тимофеевский А. Д. Модели и методы экспериментальной онкологии. – Москва: Медгиз, 1960. – 245 с.
21. Taylor S. K. // Med. Hypotheses. – 2003. – **60**, N 1. – P. 89–93.
22. Meerson F. Z., Evstigneeva M. E., Ustinova E. E. // Pat. Physiol. Exp. Therap. – 1983. – **5**. – P. 25–29.
23. Shtemenko N., Collery P., Shtemenko A. // Anticancer Res. – 2007. – **27**. – P. 2487–2492.

24. Олійник С. А., Штеменко Н. І., Горчакова Н. О. та ін. // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – **1**. – С. 11–15.
25. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. // Лаб. дело. – 1988. – **2**. – С. 41–43.
26. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. // Там же. – 1991. – **10**. – С. 9–13.
27. Dockal M., Carter D. C., Ruker F. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – С. 3042–3050.
28. Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M. // BMC Structural Biology. – 2008. – **8**. – С. 25.
29. Shtemenko N. I, Gorelaya M. V., Alexandrova L. M. // Metal Ions in Biology and Medicine. – 2002. – **7**. – P. 34–36.
30. Третьяк С. Ю., Голиченко А. А., Штеменко А. В. // Вопр. химии и хим. технологии. – 2011. – **6**. – С. 94–99.
31. Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A. // British J. Pharmacol. – 2007. – **150**. – P. 552–558.
32. Liu J., Ma L., Yin S., Hong F. // Biol. Trace Element. Research. – 2008. – **125**. – P. 170–178.

Отримано 28.12.2011