УДК 577.121.7 : 616.34-006

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ТА ВМІСТ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА У РАЗІ ДІЇ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ ЩУРІВ

О. М. ФІЛІНСЬКА, С. В. ЯБЛОНСЬКА, С. Я. МАНДРИК, І. В. ХАРЧУК, Г. В. ОСТРОВСЬКА, В. К. РИБАЛЬЧЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: filinska@inbox.ru

Похідне малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) з цитостатичною активністю у разі хронічного застосування (протягом 20 тижнів) у дозах – 0,027 і 2,7 мг/кг не спричиняє вірогідних змін продуктів пероксидного окислення ліпідів і протеїнів печінки, проте знижує активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, вміст відновленого глутатіону (ВГ). Рівень матриксної металопротеїнази-2 (ММП-2) слизової оболонки товстого кишечника під час дії МІ-1 (2,7 мг/кг) знижується втричі. За умов 1,2-диметилгідразин-індукованого колоректального канцерогенезу в клітинах печінки щурів зростає вміст тіобарбітурат-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів, ВГ, активність глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази та вміст ММП-2 у слизовій оболонці товстого кишечника. Активність ензимів першої лінії антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази і каталази – знижується до 40%. Похідне малеіміду запобігає розвитку окисного стресу у печінці і підвищенню рівня ММП-2 у товстому кишечнику, частково відновлюючи досліджувані показники в бік контрольних значень.

Ключові слова: антиоксидантна система, пероксидне окислення, колоректальний канцерогенез, похідне малеіміду, 1,2-диметилгідразин.

Колоректальний рак займає одне з провідних місць серед онкологічних захворювань. Не дивлячись на успіхи у вивченні причин та особливостей онкохвороб, частота та смертність від них продовжують зростати. Проблема злоякісного росту є однією з самих актуальних проблем в медицині та біології. Визначним досягненням в області молекулярної біології, біохімії і біотехнології останніх років є встановлення молекулярних механізмів онкогенезу та розробка нових лікарських препаратів цілеспрямованої (таргетної) дії, що селективно блокують протеїни-мішені у пухлинних клітинах, є менш токсичними і більш ефективними порівняно з традиційною неспецифічною хіміотерапією [1].

До таких препаратів відносяться і високоселективні інгібітори протеїнкіназ. Потенційною сполукою для лікування онкологічних захворювань є похідне малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) (рис. 1), що синтезований за допомогою *in silico* дизайну вченими Київського національного університету імені Тараса Шевченка. МІ-1 проявляє пригнічуючу дію на низку протеїнкіназ клітин людини, зокрема EGF-R, FGF-R1, IGF-R1, SRC, SYK, TIE2, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, YES, ZAP70, що залучені в сигнальних шляхах регуляції клітинного росту, проліферації, диференціації [2]. Встановлена виражена антипроліферативна активність МІ-1 на культурах трансформованих і пухлинних клітин (до 80–90% інгібування росту клітин у концентраціях

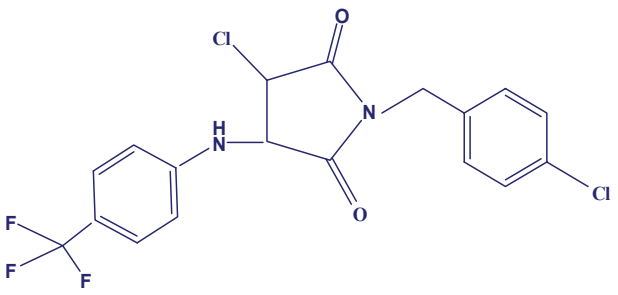

Рис. 1. Структурна формула похідного малеіміду – 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон

10–100 мкмоль/л), зокрема на таких: нирки ембріона людини лінії HEK 293, карциноми молочної залози MCF-7, HeLa, водночас найбільш ефективно він діє на культуру клітин аденокарциноми товстого кишечника SW620 [3, 4].

Для оцінки біохімічних та гістологічних особливостей розвитку пухлин широко використовується модель раку кишечника щурів, індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ, ДМГ-модель), що обумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [5]. ДМГ піддається метаболічній активації в печінці, а його інтермедіати секретуються в жовч та транспортуються до кишечника. Метаболічно активний ДМГ зумовлює модифікацію ДНК, гістонів, ДНК-зв'язуючих протеїнів клітин-мішеней.

Розвиток злоякісних пухлин, в тому числі колоректальних, супроводжується оксидативним стресом внаслідок накопичення великої кількості активних форм кисню [6], які стимулюють процеси пероксидного окислення і порушують антиоксидантні захисні системи клітини, що призводить до пошкодження протеїнів, ліпідів та ядерних і мітохондріальних ДНК [7]. З даних літератури відомо, що вільні радикали здатні не лише ініціювати рак, але й беруть участь в прогресії пухлинних клітин, підтримуючи ріст клітин, їхню інвазивність та метастатичний потенціал (за рахунок активації сигнальних шляхів) і порушення експресії генів росту та диференціювання [8].

Основним проявом злоякісного росту є необмежений інвазивний ріст та метастазування, що спричинює протеолітичну деградацію компонентів позаклітинного матриксу – базальної мембрани і міжтканевої строми, які складаються з різних структурних протеїнів: колагенів, еластинів, ламінінів тощо [9]. Матриксні металопротеїнази (ММП) – представники сімейства цинкових протеаз, розщеплюють основні протеїни позаклітинного матриксу. Експресія ММП-2 (желатиназа А, колагеназа IV типу) пухлинними клітинами забезпечує їхній інвазивний потенціал.

Метою нашої роботи є дослідження стану антиоксидантної системи в печінці щурів у разі дії похідного малеіміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону за умов розвитку 1,2-диметилгідразин-індукованого канцерогенезу товстого кишечника щурів та вмісту протеїну ММП-2, що експресується внаслідок колоректальногоу канцерогенезу.

Матеріали і методи

У дослідах використовували 65 білих щурів-самців з масою тіла 150–180 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Всі досліджувані речовини вводили тваринам протягом 20 тижнів. MI-1, розчинений в соняшниковій олії, вводили інтрагастрально щодня у дозі 0,027 та 2,7 мг/кг в об'ємі 0,1 мл. ДМГ, розчинений в фізіологічному розчині, вводили підшкірно у дозі 21 мг/кг, один раз на тиждень в об'ємі 0,1 мл [5]. Тварин поділили на 8 груп, в яких вони отримували: 1 (контрольна, $n = 7$) – соняшникову олію; 2 ($n = 8$) – 0,027 мг/кг MI-1; 3 ($n = 9$) – 2,7 мг/кг MI-1; 4 (контрольна, $n = 7$) – фізіологічний розчин; 5 ($n = 9$) – ДМГ; 6 (контрольна, $n = 7$) – фізіологічний розчин та соняшникову олію; 7 ($n = 9$) – 0,027 мг/кг ДМГ та MI-1; 8 ($n = 9$) – 2,7 мг/кг ДМГ та MI-1. Контрольні групи отримували 0,1 мл фізіологічного розчину підшкірно та/або 0,1 мл соняшникової олії інтрагастрально відповідно дослідним групам щурів.

Для визначення активності антиоксидантних ензимів та вмісту продуктів окислення тварин декапітували, попередньо застосовуючи ефірний наркоз. Печінку промивали холодним фізіологічним розчином (0,9% NaCl) за допомогою шприца через воротну вену. Плазматичні мембрани (ПМ) клітин печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [10]. Печінку (7 г) подрібнювали в чашці Петрі на льоду, після чого гомогенізували у скляному гомогенізаторі із слабо притертим тефлоновим поршнем в охолодженому буфері «виділення» наступного складу: 1 ммоль/л $NaHCO_3$, 1 ммоль/л ЕДТА (pH 7,5) у співвідношенні 1 мл буфера на 1 г тканини печінки. До отриманого гомогенату додавали 7 об'ємів буфера виділення (по відношенню до гомогенату) і фільтрували через 4 шари марлі. Фільтрат центрифугували 10 хв при 1500 g в охолодженому роторі. До одержаного осаду додавали 5,5 об'ємів сахарози I (70,74%, щільністю 1,26 d), по відношенню до осаду. У центрифужних пробірках формували

ступінчастий градієнт – 15 мл суспензії : 7 мл сахарози II (48,45%, щільністю 1,18 d) : 12 мл сахарози III (42,90%, щільністю 1,16 d). На наступному етапі проводили ультрацентрифугування протягом 60 хв при 66 000 g і 4 °С. Після цього із пробірок відбирали фракцію плазматичних мембран (ПМ) між сахарозою II і III. ПМ відмивали від сахарози у буфері «виділення» (центрифугували 10 хв при 1500 g). Залишковий осад ресуспендували в 1 мл середовища для зберігання мембран (1 об'ємна частина гліцерину : 3 об'ємні частини буфера). Критерієм чистоти фракції ПМ було визначення активностей маркерних ензимів – 5′-нуклеотидази і Na^+,K^+-АТР-ази (маркери ПМ), глюкозо-6-фосфатази (маркер мікросомної фракції).

Вміст тіобарбітурат-активних продуктів у фракції ПМ визначали фотометрично, за концентрацією забарвленого комплексу, що утворюється в результаті реакції малонового діальдегіду (МДА) у кислому середовищі з двома молекулами тіобарбітурової кислоти (ТБК) [11]. Ступінь спонтанної окисної модифікації протеїнів ПМ визначали за методом Левіна [12] у модифікації [13], що базується на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів.

Для виділення цитозольної фракції гепатоцитів 4 г печінки подрібнювали в чашці Петрі на льоду, гомогенізували у скляному гомогенізаторі із слабо притертим тефлоновим поршнем в охолодженому 0,01 М фосфатному буфері (рН 7,5), у співвідношенні – 1 г подрібненої тканини : 4 мл буфера. Одержаний гомогенат фільтрували через 4 шари марлі і центрифугували 10 хв при 1000 g в охолодженому роторі. Надосадову рідину центрифугували 2 год при 100 000 g і 4 °С для одержання цитозольної фракції. Вміст протеїну в одержаних препаратах визначали за методом Лоурі [14]. Активність ензимів визначали в цитозольній фракції клітин печінки.

Активність супероксиддисмутази (1.15.1.1, СОД) визначали спектрофотометричним методом за здатністю ензиму інгібувати реакцію відновлення нітросинього тетразолія (НСТ) рибофлавіном [11]. Активність каталази (1.11.1.6) визначали згідно методу Королюк [15], фіксуючи зміну оптичної щільності в результаті реакції H_2O_2 з солями молібдену. Вміст ВГ визначали за здатністю його тіолових груп взаємодіяти з 5,5′-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) з утворенням забарвленої сполуки тіо-2-нітробензойної кислоти [16]. Активність глутатіонпероксидази (1.11.1.9) оцінювали за зміною вмісту ВГ в пробах до і після інкубації з гідропероксидом трет-бутилу (ГПТБ) за кольоровою реакцією з ДТНБ [16]. Активність глутатіон-S-трансферази (2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення глутатіон-S-2,4-динітробензолу в реакції відновлення глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ) [16].

Вміст протеїну ММП-2 визначали в гомогенаті слизової оболонки товстого кишечника. Товстий кишечник видаляли (від ректальної ампули прямої кишки до сліпої) та промивали холодним фізіологічним розчином. Кишку вивертали слизовою оболонкою назовні, знімали шар слизової оболонки. Слизову оболонку товстої кишки гомогенізували у середовищі, яке складалося з 50 ммоль/л фосфатного буфера (рН 7,0) з додаванням 1 ммоль/л ЕДТА та 0,4 ммоль/л фенілметансульфонілфториду. Гомогенат центрифугували при 10 000 g протягом 15 хв. Електрофорез одержаних проб (надосадова рідина) проводили у 8% ПААГ в денатуруючих умовах по Laemmli [17]. Форез проводили в трис-гліциновому буфері (рН 8,3) при напрузі 15–20 В/см^2. Імуноблотинг проводили за описаним методом [18]. Після електрофорезу гель відмивали в буфері PBS-T та переносили протеїни в камері (B 2157, Sigma, США) у середовищі, що містить: 25 ммоль/л тріс, 200 ммоль/л гліцину і 20% метанолу, за умов 15–16 В/см^2 з використанням джерела постійного струму ПЕФ-3. Вільні сайти сорбції блокували 5% знежиреним молоком у буфері PBS-T. Після цього нітроцелюлозну мембрану інкубували 1 год з поліклональними антитілами проти ММП-2 (1 : 200, Chemicon, США). Мембрану відмивали в буфері PBS-T, інкубували з антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону. Після відмивання в буфері PBS-T мембрану витримували 2 хв у реагенті наступного складу: 2,5 ммоль/л люмінолу, 0,4 ммоль/л кумарової кислоти, 0,02% H_2O_2 в 0,1 ммоль/л трис-HCl, рН 8,5 та експонували на рентгенівську плівку. Кількісну обробку результатів імуноблот-аналізу здійснювали з використанням комп'ютерної програми TotalLab v 2.01. Математичну обробку експериментальних результатів проводили за допомогою програм статистичного пакету аналізу даних в Microsoft Excel. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

У роботі [19] було проведено оцінку гепатотоксичності новосинтезованої сполуки МІ-1

в умовах оксидативного стресу, викликаного хлоридом кобальту (II). Встановлено, що МІ-1 не має вираженого впливу на ензими, що є маркерами пошкодження клітин печінки: активність аспартатамінотрансферази під впливом МІ-1 не змінюється, активність аланінамінотрансферази має тенденцію до зниження на 15% порівняно з контрольними значеннями, що свідчить про відсутність вираженої гепатотоксичності похідного малеіміду. МІ-1 не порушує процеси пероксидного окислення ліпідів та протеїнів і не спричиняє значних змін антиоксидантної системи печінки щурів після одноразового чи десятиденного інтрагастрального введення. Крім того, похідне малеіміду частково попереджає пошкоджуючий вплив $CoCl_2$ на печінку, нормалізуючи показники вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів та протеїнів, ензимів антиоксидантної системи до контрольних значень.

Дослідження впливу МІ-1 на розвиток оксидативного стресу в печінці щурів з ДМГ-моделлю товстого кишечника проводили на групах тварин, яким різним способом вводили МІ-1 і ДМГ (окремо та сумісно), тому їх порівнювали з відповідною контрольною групою. Встановлено, що кількість і розмір пухлин у ДМГ-індукованій групі тварин більші, ніж у тих, яким вводили ДМГ і МІ-1 сумісно. Відрізняється також морфологія і локалізація пухлин: у ДМГ-індукованої групи щурів більшість пухлин належить до аденокарцином і знаходиться у дистальному відділі та в прямій кишці, тоді як у груп щурів, яким сумісно вводили ДМГ і МІ-1 переважають аденоми, що локалізуються в основному в дистальному і проксимальному відділі товстого кишечника [20].

Всі досліджувані показники антиоксидантної системи печінки у інтактної (контрольної) групи щурів є близькими за значеннями до контрольної групи, що отримувала фізіологічний розчин. МІ-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг не викликає змін вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 2, *а*) та карбонільних груп протеїнів в ПМ клітин печінки (рис. 2, *б*). Дослідження активності СОД і каталази, показало, що активність каталази не змінюється за даних умов (рис. 3, *а*), але спостерігається тенденція до пригнічення активності СОД на 25% ($P < 0,1$) порівняно з контрольними значеннями (рис. 3, *б*). Одержані результати співпадають з попередніми [19], згідно яких під час десятиденного введення МІ-1 активність СОД печінки щурів знижується в 1,8 раза, тоді як активність каталази залишається на рівні контролю. Зареєстроване нами зниження активності СОД під впливом МІ-1, очевидно, обумовлено не дією токсичних пероксидних продуктів, оскільки вміст ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів і активність каталази не змінюються, а іншими факторами. Так, експресія Cu/Zn-СОД в умовах оксидативного стресу знаходиться під регуляторним контролем сигнального кіназного каскаду PI3K/Akt

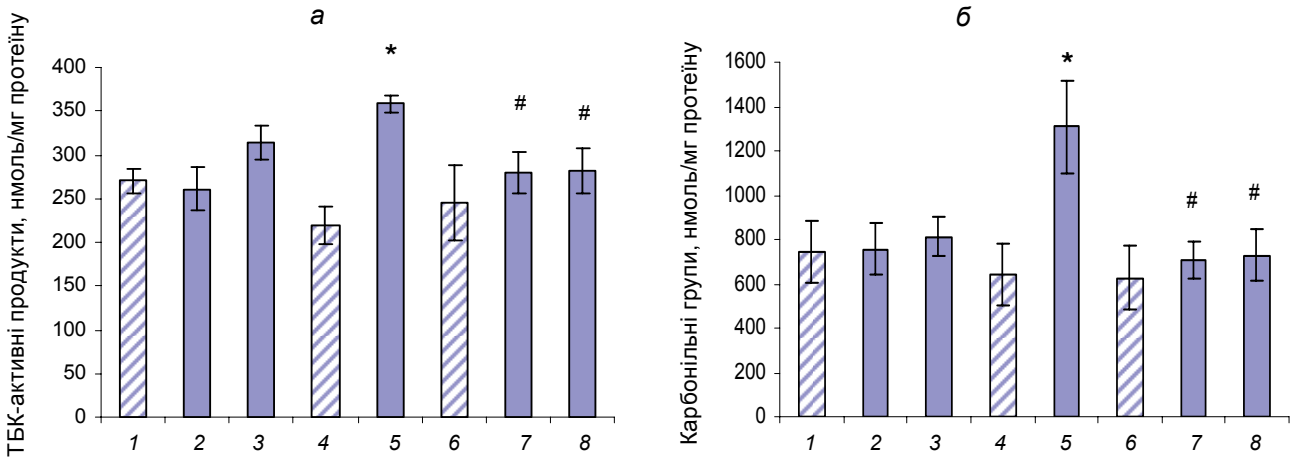

*Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів (а) та карбонільних груп (КГ) протеїнів (б) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів в умовах ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу і у разі сумісного застосування ДМГ з МІ-1. Тут і на рис. 3–5 групи тварин, що отримували: 1 (контрольна) – соняшникову олію; 2 – МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; 3 – МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг; 4 (контрольна) – фізіологічний розчин; 5 – ДМГ; 6 (контрольна) – фізіологічний розчин та соняшникову олію; 7 – ДМГ та МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; 8 –ДМГ та МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг. * $P < 0,01$ відносно контролю; # $P < 0,05$ відносно групи з ДМГ*

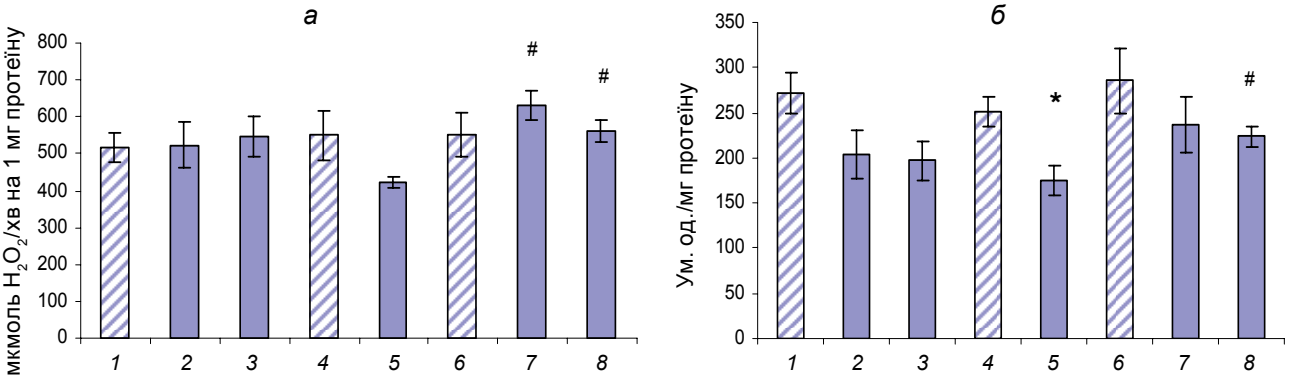

Рис. 3. Активність каталази (а) та супероксиддисмутази (б) у цитозолі гепатоцитів щурів в умовах ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу і у разі сумісного застосування ДМГ з МІ-1

[21], а він, в свою чергу, тісно пов'язаний з активацією низки мембранних тирозин-кіназних рецепторів, зокрема інсулінового (INS-R) та рецептора інсуліноподібного фактору росту (IGF1-R), які, блокуються мікромолярними концентраціями МІ-1. Таке пригнічення вказаних рецепторів може бути однією з причин зниження активності СОД під час тривалого впливу МІ-1[2].

В умовах експериментальної моделі раку товстого кишечника, викликаного ДМГ, встановлено, що вміст ТБК-активних продуктів та карбонільних груп окислених протеїнів ПМ клітин печінки підвищується в 1,75 та 2 рази відповідно (рис. 2). Активність каталази під впливом ДМГ має тенденцію до зниження на 21%, СОД – на 43% (рис. 3), що призводить до накопичення вільних радикалів і може сприяти пошкодженню клітин печінки. Рівень ПОЛ тісно пов'язаний із активністю антиоксидантних ензимів, що утворюють єдиний метаболічний ланцюг, в результаті функціонування якого активні форми кисню перетворюються у воду, спирти та інші нетоксичні для організму метаболіти [11]. Сполуки, що є промоторами пухлинного росту, в тому числі і ДМГ, стимулюють утворення активних форм кисню, який викликає порушення окисного гомеостазу і, як наслідок, підвищується вміст продуктів пероксидного окислення. Отже, за умов метаболічної активації ДМГ у печінці та розвитку пухлин (у тому числі колоректальних), порушується рівновага між інтенсивністю дії прооксидантних факторів і потужністю антиоксидантної системи клітин печінки щурів, що призводить до надмірної активації процесів пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів ПМ гепатоцитів.

Під час сумісного застосування ДМГ та МІ-1 не зареєстровано вірогідних змін вмісту ТБК-активних продуктів і карбонільних груп протеїнів, активності каталази та СОД у порівнянні з контролем. Але вміст продуктів окисної модифікації ліпідів і протеїнів значно нижчий, ніж у разі окремої дії ДМГ (рис. 2, 3). Так, встановлено, що вміст ТБК-активних продуктів знижується в середньому на 25% у разі застосування двох зазначених доз МІ-1, а вміст карбонільних груп протеїнів – майже вдвічі. Активність СОД та каталази через дію МІ-1 підвищується до 35% та наближується до контрольних значень. Одержані дані свідчать, що МІ-1 сприяє нормалізації вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів, окисної модифікації протеїнів і активності антиоксидантних ензимів у печінці, що порушуються під час дії ДМГ.

Таким чином, в умовах експериментальної ДМГ-моделі раку товстого кишечника у щурів підвищується вміст ТБК-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів ПМ гепатоцитів, що свідчить про посилення деструктивних процесів пероксидного окислення в печінці тварин, і, як наслідок, відбувається зниження активності ензимів першої ланки антиоксидантного захисту – СОД та каталази. Похідне малеіміду не викликає змін вмісту продуктів ПОЛ, окислення протеїнів та активності каталази, але за його дії активність СОД має тенденцію до зниження. Під час хімічної індукції раку товстого кишечника у щурів МІ-1 запобігає розвитку оксидативного стресу в печінці тварин, нормалізує вміст ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів, активність СОД і каталази.

Ключова роль у захисті клітини від оксидативного стресу відводиться системі глутатіону [22]. До складу цієї системи, активність якої найвища у клітинах печінки, входять природний антиоксидант – ВГ та глутатіонзалежні

ензими, такі як глутатіонпероксидаза та глутатіон-S-трансфераза. Вони послідовно відновлюють супероксидрадикали, H_2O_2 та органічні гідропероксиди. Узгоджена робота глутатіон-S-трансферази та глутатіонпероксидази попереджає подальше прогресування пероксидації та накопичення вторинних метаболітів. Результати досліджень свідчать [23], що в печінці та інших тканинах тварин у нормі та патології процеси пероксидного окислення регулюються переважно захисною глутатіоновою системою. Відомо, що печінка є основним органом для синтезу глутатіону, де він і виконує свою головну детоксикуючу функцію. МІ-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг викликає зниження вмісту ВГ в цитозолі печінки щурів на 48 та на 34% відповідно (рис. 4). ДМГ підвищує рівень ВГ на 58%. У разі ДМГ-індукованого канцерогенезу МІ-1 знижує даний показник до 32% ($P < 0,15$), що дорівнює контрольним значенням. Низький рівень ВГ за дії МІ-1 не пов'язаний з порушенням функцій печінки, і як наслідок, зі збільшенням кількості токсинів. У роботі [24] було встановлено, що МІ-1 за даних умов не викликає змін активності аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази та лактатдегідрогенази. Активність аланінамінотрансферази знижувалась на 20%, що могло бути наслідком функціонального навантаження печінки. Про неістотне порушення печінкової секреції під впливом МІ-1 свідчило незначне підвищення вмісту прямого білірубіну. Також МІ-1 не викликає підвищення ТБК-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів (рис. 2). У роботі [25] встановлено зменшення пулу ВГ інгібіторами PI3K/Akt сигнального шляху, який в свою чергу тісно пов'язаний з рецепторами

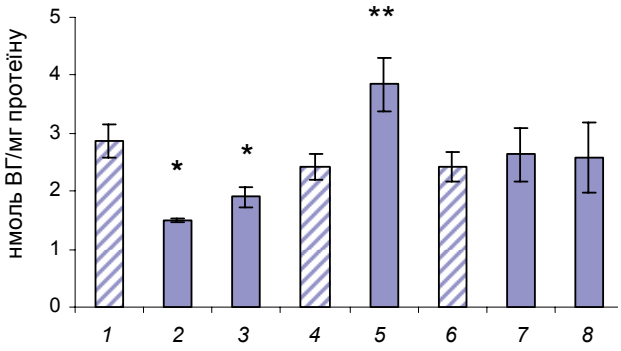

*Рис. 4. Вміст відновленого глутатіону (ВГ) у цитозолі гепатоцитів щурів в умовах ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу і у разі сумісного застосування ДМГ з МІ-1. * $P < 0,02$; ** $P < 0,05$ відносно контролю*

ендотеліального фактора росту (EGF-R), фактора росту судинного ендотелію (VEGF-R), інсуліноподібного фактора росту (IGF1-R), що інгібуються МІ-1. Можливо, зниження вмісту ВГ похідним малеіміду може бути одним із наслідків блокування тирозинових протеїнкіназ.

Аналогічна закономірність спостерігається під час дослідження активності глутатіонпероксидази (рис. 5, *а*). МІ-1 знижує активність ензиму на 37% у дозі 0,027 мг/кг і на 30% у дозі 2,7 мг/кг, що може бути наслідком зменшення вмісту ВГ. У групі тварин з ДМГ-індукованим раком товстого кишечника активність глутатіонпероксидази зростає на 70%, що можна пояснити участю ензиму в знешкодженні ксенобіотика. Завдяки дії МІ-1 у дозах, що досліджували цей показник наближається до рівня контролю. МІ-1 не призводить до змін активності глутатіон-S-трансферази (рис. 5,

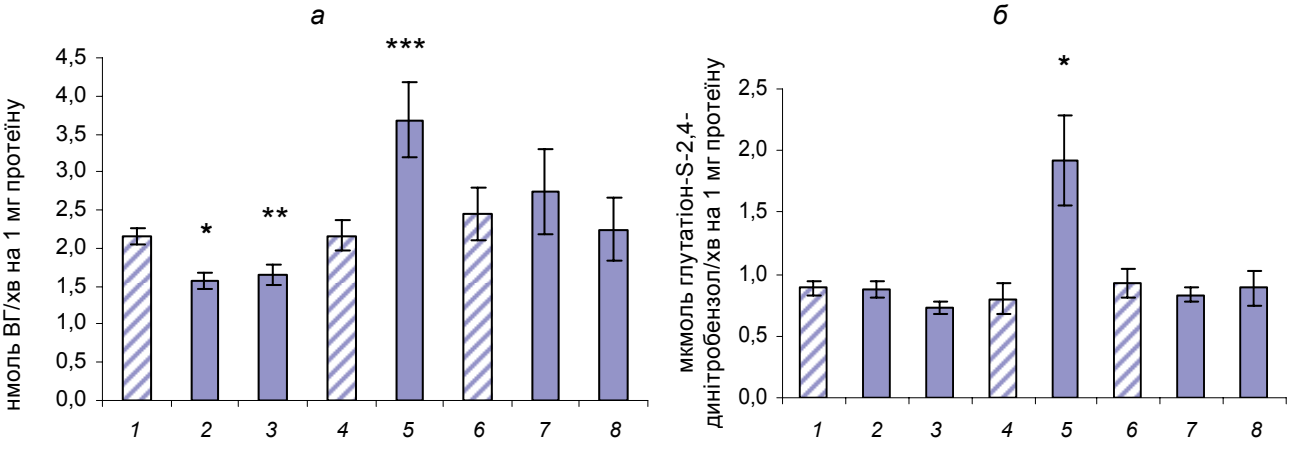

*Рис. 5. Активність глутатіонпероксидази (а) та глутатіон-S-трансферази (б) у цитозолі гепатоцитів щурів в умовах ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу і у разі сумісного застосування ДМГ з МІ-1. * $P < 0,02$; ** $P < 0,03$; *** $P < 0,05$ відносно контролю*

б). Активність ензиму підвищується в 2,4 раза в умовах ДМГ-індукованого канцерогенезу. Проте під дією МІ-1 цей показник знижується вдвічі ($P < 0,09$), що відповідає контрольному рівню.

Таким чином, МІ-1 знижує вміст ВГ та активність глутатіонпероксидази, що може бути спричинено інгібуванням тирозинових протеїнкіназ. В умовах розвитку колоректального канцерогенезу у щурів вміст ВГ, активність глутатіон-залежних ензимів – глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази, в цитозолі печінки зростає. Інші дослідження [26] показують різнонаправлені зміни активності антиоксидантних ензимів та вмісту ВГ за умов колоректального канцерогенезу. За даними Anilakumar і співавторів ДМГ-індукований колоректальний канцерогенез, викликаний протягом 12 тижнів, призводить до зниження вмісту ВГ та активності глутатіонпероксидази печінки, що супроводжується підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів [27]. У разі експериментального раку товстого кишечника у щурів [28] та колоректального канцерогенезу у людей з 2–4 клінічними стадіями [6] встановлено підвищення рівня пероксидного окислення ліпідів з підвищенням вмісту ВГ та ензимів глутатіонової системи товстого кишечника. Відомо, що ВГ та глутатіонзалежні ензими у великій кількості експресуються в пухлинних клітинах [28]. Можливо, це пов'язано із зростанням вмісту оксидантів, що викликають експресію генів, які кодують ензими антиоксидантної системи [6]. Підвищення активності глутатіонзалежних ензимів також може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів пероксидного окислення ліпідів, детоксикації, деградації та виведення з організму проканцерогенів. Ці зміни супроводжуються підвищенням рівня ВГ, що є косубстратом для ензимів.

Отже, МІ-1 не викликає істотних порушень пероксидних процесів у клітині і тим самим не сприяє утворенню активних форм кисню, але зумовлює пригнічення активності СОД, глутатіонпероксидази та вмісту ВГ у цитозолі печінки щурів. Одним із пояснень зниження активності СОД, пулу ВГ, відповідно і активності глутатіонпероксидази за дії МІ-1 є зменшення експресії даних протеїнів шляхом блокування тирозинових протеїнкіназ. Внаслідок ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу вміст ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів, ВГ та активність глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази у цитозолі печінки зростає. Активність

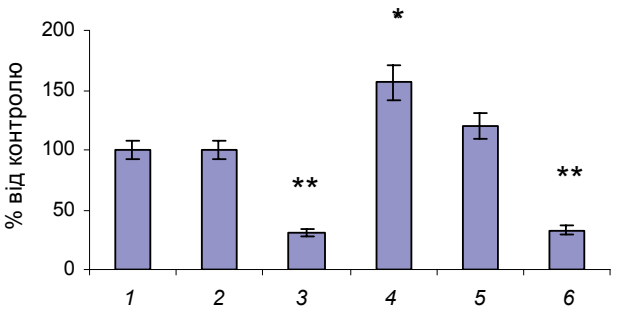

*Рис. 6. Зміна вмісту ММП-2 (відносно відповідного контролю за даними Вестерн блотингу) у гомогенаті слизової оболонки товстого кишечника в умовах ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу і у разі сумісного застосування ДМГ з МІ-1: 1 – контрольна група; 2 – МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; 3 – МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг; 4 – ДМГ; 5 – ДМГ та МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; 6 – ДМГ та МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ відносно контролю*

СОД та каталази за даних умов знижується. Це свідчить про посилення деструктивних процесів пероксидного окислення та активацію детоксикаційних функцій в печінці. МІ-1 запобігає розвитку оксидативного стресу в печінці у разі колоректального канцерогенезу частково відновлюючи досліджувані показники до контрольних значень.

Останнім часом відбувається активний пошук біохімічних маркерів, які б дозволили ідентифікувати ризик виникнення метастазів через онкологічні захворювання [29]. Матриксні металопротеїнази вивчаються в якості прогностичних факторів пухлинного процесу. Клінічні дослідження колоректального раку показали підвищення експресії ММП-2, що відіграє важливу роль в інвазивних процесах та метастазуванні [9]. Також є дані, що радикали кисню підвищують секрецію ММП та призводять до продукції ангіогенних факторів [30]. Дослідження вмісту протеїну ММП-2 (72 кДа) методом Вестерн блотингу в гомогенаті слизової оболонки товстого кишечника показало, що МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг не зумовлює істотних змін порівняно з контрольним рівнем протеїну, тоді як у групі щурів з ДМГ-індукованим канцерогенезом спостерігається найбільший рівень ММП-2 (156% по відношенню до контролю), що відображає розвиток пухлинних процесів в даній групі тварин (рис. 6). Сумісне застосування ДМГ та МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг спричинює дещо нижчий рівень ММП-2, який, проте, не досягає контрольного значення (120% відносно контролю). У групі

тварин, якій вводили МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг за умов колоректального канцерогенезу та завдяки дії самого МІ-1 у цій дозі, рівень ММП-2 знижується у 3 рази порівняно з контрольною групою та майже в 6 разів порівняно з групою, що отримувала ДМГ. Таким чином, МІ-1 (у дозі 2,7 мг/кг) може пригнічувати експресію ММП-2 в нормальних клітинах і надекспресію ММП-2 в трансформованих клітинах та тим самим знижувати інвазивний потенціал пухлинних клітин внаслідок індукованого канцерогенезу раку товстого кишечника. Це свідчить на користь можливості застосування МІ-1 у лікарській практиці як потенційного інгібітора металопротеїназ.

Отже, у разі тривалого застосування похідного малеіміду – 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону не спостерігається змін вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів і протеїнів ПМ гепатоцитів, знижується активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та вміст відновленого глутатіону в цитозолі печінки щурів, що може бути опосередковано блокуванням тирозинових протеїнкіназ [2]. За умов колоректального канцерогенезу індукованого ДМГ, МІ-1 запобігає розвитку окисних процесів у печінці, відновлюючи всі показники до контрольних значень та знижує рівень ММП-2 у слизовій оболонці товстого кишечника.

Робота виконана за сприйняття гранта Президента України для підтримки наукових досліджень молодих вчених (№ 336/2008-рп від 16 грудня 2008 р.).

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ И СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА У КРЫС

Е. М. Филинская, С. В. Яблонская, С. Я. Мандрык, И. В. Харчук, Г. В. Островская, В. К. Рыбальченко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина; e-mail: filinska@inbox.ru

Производное малеимида – 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF_3-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион (МИ-1) с цитостатической активностью при хроническом применении (на протяжении 20 недель) не изменяет содержание продуктов пероксидного окисления липидов и протеинов печени, хотя понижает активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и содержание восстановленного глутатиона (ВГ) в дозах – 0,027 и 2,7 мг/кг. Уровень матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) в слизистой оболочке толстого кишечника под действием МИ-1 (2,7 мг/кг) уменьшается в 3 раза. В условиях 1,2-диметилгидразин-индуцированных опухолей толстого кишечника у крыс в клетках печени повышается содержание тиобарбитурат-активных продуктов, карбонильных групп протеинов, ВГ, металлопротеиназы-2, а также активность глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Активность энзимов первой линии антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы и каталазы – снижается до 40%. Производное малеимида предотвращает развитие окислительного стресса, частично восстанавливая исследуемые показатели до контрольных значений.

Ключевые слова: антиоксидантная система, пероксидное окисление, колоректальный канцерогенез, производное малеимида, 1,2-диметилгидразин.

STATE OF THE LIVER ANTIOXIDANT SYSTEM AND CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 OF LARGE INTESTINE UNDER THE EFFECT OF MALEIMIDE DERIVATIVE IN EXPERIMENTAL COLON CARCINOGENESIS IN RATS

O. M. Filinska, S. V. Yablonska, S. Y. Mandryk, I. V. Kharchuk, G. V. Ostrovska, V. K. Rybalchenko

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine; e-mail: filinska@inbox.ru

Summary

The maleimide derivative – 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF_3-phenylamino)-1H-pyrrol-2.5-dione (MI-1) with cytostatic activity did not cause substantial changes of liver antioxidant system and level of matrix metalloproteinase-2 in intestinal mucosa after chronic treatment (for 20 weeks). MI-1 did not cause significant changes in the content of thiobarbituric-active products and plasma membrane protein carbonyl groups in the rat liver. However activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and content of reduced glutathione were decreased in both doses – 0.027 and 2.7 mg/kg. The level of matrix metalloproteinase-2

in intestinal mucosa was decreased just in maximum dose – 2.7 mg/kg. The contents of thiobarbituric-active products, protein carbonyl groups, reduced glutathione, matrix metalloproteinase-2, activities of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase in the liver cells have increased in 1.2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. The activities of enzymes of the first line of antioxidant defense – superoxide dismutase and catalase were decreased to 40%. The maleimide derivative prevents development of oxidation stress and partially reduce them to control level.

K e y w o r d s: antioxidant system, peroxidation, colon carcinogenesis, maleimide derivative, 1.2-dimethylhydrazine.

1. *Blume-Jensen P., Hunter T.* // Nature. – 2001. – **411**. – P. 355–365.
2. *Пат № 22204* (Україна). Сполуки 1,4-двозаміщені 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-діон, що мають протиракову активність / Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М. Опубл. 25.04.2007.
3. *Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін.* // Журн. органіч. та фармацев. хімії. – 2007. – **5**, № 1. – С. 39–49.
4. *Yablonska S., Lynchak O., Filinska O. et al.* // The FEBS J. – Life's Molecular Intractions: 34th FEBS Congress. – Prague, Czech Republic, 2009. – P. 352.
5. *Perse M., Cerar A.* // Radiol. Oncol – 2005. – **39**, N 1. – P. 61–70.
6. *Skrzydlewska E., Sulkowski S., Koda M. et al.* // World J. Gastroen. – 2005. – **11**, N 3. – P. 403–406.
7. *Тодоров И. Н., Тодоров Г. И.* // Биохимия. – 2009. – **74**, вып. 9. – С. 1184–1194.
8. *Панченко А. В., Петрищев Н. Н., Кветной И. М. и др.* // Вопр. онкологии. – 2008. – **54**, № 3. – С. 332–337.
9. *Nemoto T., Kubota S., Ishida H. et al.* // Gastroenterol. – 2005. – **11**, N 20. – P. 3065–3069.
10. *Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B. et al.* // J. Cell Biol. – 1969. – **41**, N 1. – P. 124–131.
11. *Артюхов В. Г., Наквасин М. А.* Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. – Воронеж: Изд. Воронежского гос. ун-та, 2000.– 295 с.
12. *Levine R. L., Garland D., Oliver C. N. et al.* // Methods Enzymol. – 1990. – **186**. – P. 464–478.
13. *Дубинина Е. Е., Морозова М. Г., Леонова Н. В. и др.* // Вопросы мед. химии. – 2000. – **46**, № 4. – С. 398–409.
14. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
15. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др.* // Лаб. дело. – 1988. – **1**. – С. 16–19.
16. *Медицинские* лабораторные технологии. Справочник в 2-х т. / Под ред. А. И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.
17. *Laemmli U. K.* // Nature. – 1970. – **227**, N 52. – P. 680–685.
18. *Avrames S., Termynck T.* // Mol. Immunol. – 1993. – **30**. – P. 119–127.
19. *Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 5. – С. 83–92.
20. *Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V.* // Gut "GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London". – 2009. – **58** (Suppl. II). – P. A334.
21. *Rojo A. I., Salinas M., Martнn D. et al.* // J. Neuroscience. – 2004. – **24**, N 33. – P. 7324–7334.
22. *Колесниченко Л. С., Кулинский В. И.* // Успехи совр. биол. – 1989. – **107**, № 2. – С. 179–194.
23. *Керимов Б. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 108–113.
24. *Філінська О. М., Яблонська С. В., Линчак О. В.* // Проблеми екологічної та медичної генетики і клітинної імунології. Зб. наук. праць. – 2009. – **8**, № 95. – С. 75–83.
25. *Wang L., Chen Y., Sternberg P. et al.* // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – **49**, N 4. – P. 1671–1678.
26. *Chadha V. D., Vaiphei K., Dhawan D. K.* //Mol. Cell. Biochem. – 2007. – **304**. – P. 101–108;
27. *Anilakumar K. R., Khanum F., Krishna K. R. S. et al.* //Plant Foods for Human Nutrition. – 2003. – **58**. – P. 1–11.
28. *Manju V., Balasubramaniyan V., Nalini N.* // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2005. – **10**, N 3. – P. 535–550.
29. *Спирина Л. В., Кондакова И. В., Клишко Е. В. и др.* // Сибирский онколог. журн. – 2007. – **1**, № 21. – С. 67–71.
30. *Brown N. S., Jones A., Fujiyama C. et al.* // Cancer Res. – 2000. – **60**. – P. 6298–6302.

Отримано 01.07.2010