

ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО ЦИАНСОДЕРЖАЩИХ ЛАКТОНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ И ПРОЦЕССЫ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ САРКОМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

П. А. Казарян, Г.М. Галоян, М. О. Хачикян, Р. Х. Саакян

Гематологический центр МЗ РА

Международная Академия Образования Армении

Институт биохимии им. Г.Бунятына НАН РА

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

Выявление патогенетических механизмов и разработка более эффективных методов терапии опухолей требуют проведение целенаправленных исследований. Вместе с тем установлено, что активные формы кислорода (АФК) являются ключевыми факторами развития злокачественных новообразований [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]. Накопление АФК вызывает 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_\cdot , ингибированием антиоксидантной системы, снижением стабильности эритроцитов и повышением

степени анемии [10]. При этом (интерферон бета, ретиноевая, кофеиновая и фериликовая кислоты), стимулируют НАДРН-оксидазы и 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-олид (ЦТБО) – соединения, обладающего СОД-миметической активностью при канцерогенезе.

Целью настоящей работы является определение характерных изменений эндогенного уровня и активности металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) и металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО), а также продукта липидной перекисидации – 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 15 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 внутрибрюшинно 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, Mn-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-зависимой супероксид (O_2^-)-продуцирующую активность фракции цит b558 в гомогенной и фазах (в МКП) определяли нитротетразолиевым синим методом [2].

Метгемоглобин (метHb) восстанавливающую активность фракции цит b558 МКП в гомогенной фазе определяли оптическим спектральным методом, путем вычисления процента снижения плотности максимального оптического поглощения при 565 нм метHb крыс (A_{565} в реакционной смеси составлял 0,8) в присутствии фракции цит b558 (A_{530} в реакционной смеси составляло 0,03). Для определения метHb-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 отсутствии 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 1см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-

Фишера с определением критерия достоверности (Р).

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 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, ассоциированного 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 с 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 цитохромом b558 (O_2 - и НО $_2$ стимулируют перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов биомембран) [6]. С участием цит b558 стимулируется и 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).

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.

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 < 0,01, n = 15)

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)

R_x Ամփոփում

ՑԻԱՆ ԽՈՒՄԲ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԼԱԿՏՈՆՆԵՐԻ ԱԾԱՆՑՅԱԼԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԵՏԱՂԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՑՆԵՐԻ ՎՐԱ ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՍԱՐԿՈՄԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Պ.Ա. Ղազարյան, Գ.Մ. Գալոյան, Մ. Հ. Խաչիկյան, Ռ.Խ. Սահակյան

Առնետների մոտ սարկոմա-45-ի (Ս-45-ի) աճման սկզբնական փուլում (15 օրվա ընթացքում) դիտվում է յարդի բջիջների թաղանթներից անջատված ցիտոքրոմ b558-ի նոր իզոմերի ֆրակցիայի մակարդակի և ՆԱԴՔԻ-կախյալ O₂- - գոյացման ակտիվության աճ և մեթ Հb-վերականգնման ակտիվության նվազում: Միաժամանակ յարդում կատարվում է Cu, Zn – ՍՕԴ-ի, Mn-ՍՕԴ-ի և կատալազի ակտիվության անկում և մալոնային դիալդեհիդի մակարդակի աճ: 2-ցիան-3,4,4-տրիմեթիլ-2-բուտեն-4-օլիդ միացության (17մգ/կգ, 8 անգամ) ներորովայնային ներարկման ժամանակ դիտվում է հետազոտված ցուցանիշների նորմավորման միտում (մոտ 40%-ով կանխելով Ս-45-ի աճը):

R_x Summary

ACTION OF DERIVATIVE OF CYAN-CONTAINING LACTONES ON METABOLISM OF METALLOPROTEINS AND PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION AT SARCOMA IN EXPERIMENT

P.A. Ghazaryan, G.M. Galoyan, M. H. Khachikyan, R. Kh. Sahakyan

The increase of the level and NADPH-dependending O₂- -producing and methemoglobin-reducing activities of the fraction of new isoform of cytochrome (cyt) b558 from rat liver cells membranes is observed at the initial stage (during 15 days) of the sarcoma-45 (S-45) growth. Simultaneously the decrease of the Cu,Zn-SOD, Mn-SOD and catalase activities and the increase of the malone dialdehyde level in the liver take place. Intra-abdominal injection of the compound 2-cian-3,4,4-trimethyl -2-buten-4-olid (17 mg/kg, 8 times) is regarded standardization trend indicators surveyed (40% in preventing the growth of S-45).

Р Литература

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. 1972, С 252.
2. Симонян Г.М. Автореф. канд.дис. “Оксидативный стресс при злокачественных новообразованиях”. Ереван, 2003, С 25.
3. Симонян Г.М., Симонян М.А., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобретения N908 Армпатента. Ереван, 2001.
4. Р.М.Симонян, В.А.Чавушян и др. Мембраностабилизирующие эффекты *Stevia rebaudiana* Bertoni при фруктозо-индуцированном диабете второго типа у крыс // Медицинская наука Армении НАН РА т. LV № 3 2015, стр. 51-60.
5. Симонян М.А., Симонян 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, 327-337.
8. Kawanishi S., Inoue S. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species. *Seikagaku* , 1997, 68, 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, 787-790.
10. Kipiani V.A., Gambashidze K.G. et al. Changes in the prooxidant and antioxidant status of tissue during paraneoplastic processes. *Bull.Exp.Biol.Med.*, 2000, 141, 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, 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, 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, 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.Rozwoj.*, 2006, 10, 855-859.
15. Rohrdanz E., Kohl R. Relation of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic.Biol.Med.*, 1998, 24, 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, 3-6.
17. Sohal R.S. Mitochondria generate O₂- and H₂O₂. *FASEB J.*, 1997, 11, 1269-1270.
18. Vignais P.V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol.Life.Sci.*, 2002, 59, 1428-1459.
19. Wu W.S. The signaling mechanism of reactive oxygen species in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, 25, 695-705.