

О. М. Філінська, С. В. Яблонська, О. В. Линчак, А. П. Бурлака,
Г. В. Островська, Т. В. Рибальченко, Є. В. Лук'янчук

Вплив похідного малеїміду на розвиток окисного стресу в печінці при індукованому 1,2-диметилгідразином канцерогенезі товстого кишечника щурів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

Досліджено стан антиоксидантної системи, вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і окисної модифікації білків печінки щурів та швидкість нагромадження молекулярного маркера окисної модифікації ДНК – 8-оксогуаніну при дії похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) за умов розвитку експериментального канцерогенезу товстого кишечника щурів, індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ). MI-1 попереджає як зміни у вмісті продуктів тіобарбітурової кислоти, карбонільних груп білків плазматичної мембрани печінки щурів, активності супероксиддисмутази й каталази цитозолу печінки, так і швидкості нагромадження 8-оксогуаніну, що викликані ДМГ.

Вагомим досягненням в області молекулярної біології, біохімії та біотехнології останніх років є встановлення молекулярних механізмів онкогенезу та розробка нових підходів у лікуванні онкологічних захворювань. Новітні лікарські препарати направленої дії, що селективно блокують білки-мішені в пухлинних клітинах, є менш токсичними, а в порівнянні з традиційною неспецифічною хіміотерапією збільшують ефективність лікування [1].

Однією з важливих регуляторних систем передачі сигналу в клітині є протеїнкінази, порушення роботи яких спричиняє різноманітні патології, в тому числі онкологічні. Потенційною сполукою для лікування онкологічних захворювань є похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1), що завдяки просторовій структурі молекули взаємодіє з АТФ-зв'язуючим центром тирозинових протеїнкіназ і слугує їх ефективним блокатором [2]. MI-1 проявляє цитостатичну дію на лініях трансформованих і пухлинних клітин людини, найбільш ефективно він впливає на культуру клітин аденокарциноми товстого кишечника SW620 [3, 4].

Для оцінки гістологічних та біохімічних особливостей розвитку пухлин широко використовується модель раку кишечника щурів, індукованого 1,2-диметилгідразином (ДМГ), що зумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [5]. ДМГ піддається метаболічній активації в печінці, а його інтермедіати надходять у жовч та транспортуються до кишечника. Метаболічно активний ДМГ зумовлює модифікацію ДНК, гістонів, ДНК-зв'язуючих білків клітин-мішеней [5]. Розвиток злоякісних пухлин, в тому числі колоректальних, супроводжується оксидативним стресом внаслідок нагромадження великої кількості активних форм кисню [6], які стимулюють процеси перекисного окиснення і порушують антиоксидантні захисні системи клітини, що призводить до пошкодження білків, ліпідів та ядерних і мітохондріальних ДНК [7].

У багатостадійному процесі канцерогенезу одним з ключових чинників є пошкодження ДНК. Серед продуктів окисного ураження пуринів найбільшу увагу приділяють вивченню окисних модифікацій гуаніну, що проявляє високу чутливість до дії активних форм

кисню, а продукти його окиснення 8-гідрокси-2'-дезоксогуанозин (8-oxod-Gu) та 8-оксогуанін (8-охо-G) виявляються в тканинах різних органів, крові, сечі та є маркером окисного пошкодження ДНК [8].

Метою нашої роботи було дослідження стану антиоксидантної системи, вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів і окисної модифікації білків у печінці щурів та швидкість нагромадження молекулярного маркера окисної модифікації ДНК — 8-охо-G при дії похідного МІ-1 за умов розвитку канцерогенезу товстого кишечника щурів, індукованого ДМГ.

Методи та результати досліджень. У ході дослідів використовували білих щурів-самців з початковою масою 150–180 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. МІ-1, що розчинений в соняшниковій олії, вводили інтрагастрально щодня протягом 20 тижнів у дозі 0,027 мг/кг та 2,7 мг/кг маси тіла в об'ємі 0,1 мл. ДМГ, розведений у фізіологічному розчині — підшкірно у дозі 21 мг/кг один раз на тиждень в об'ємі 0,1 мл [5]. Тварин було поділено на 8 груп, з яких контрольні 3 групи, що отримували 0,1 мл фізіологічного розчину підшкірно та/або 0,1 мл соняшnikової олії інтрагастрально відповідно дослідним групам щурів. До 1-ї групи (контрольної) вводили фізіологічний розчин; до 2-ї — ДМГ; до 3-ї (контрольної) — соняшникову олію; до 4-ї — МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; до 5-ї — МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг; до 6-ї (контрольної) — фізіологічний розчин та соняшникову олію; до 7-ї — ДМГ й МІ-1 у дозі 0,027 мг/кг; до 8-ї — ДМГ й МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг. Швидкість нагромадження 8-охо-G визначали у сечі щурів. Тварин відсаджували на добу в камери для збору сечі і утримували на стандартній дієті. Зібрану сечу фільтрували, замірювали добовий об'єм. Окисномодифікований гуанін екстрагували із визначеної аліквоти сечі шляхом її фільтрації через картридж з наповнювачем DSC-18 виробництва Cayman Chemical Company (USA) з подальшим відмиванням метанолом. Спектрофотометрично визначали кількість 8-охо-G та розраховували його швидкість екскреції (нмоль/(доба · г) маси тіла) [8].

Для визначення активності антиоксидантних ферментів та вмісту продуктів окиснення в печінці щурів тварин декапітували, застосовуючи інгаляційний ефірний наркоз. Печінку промивали холодним фізіологічним розчином (0,9%-й NaCl) за допомогою шприца через воротну вену. Плазматичні мембрани (ПМ) клітин печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [9]. У фракції ПМ фотометрично визначали вміст ТБК-активних продуктів [10], ступінь спонтанної окисної модифікації білків ПМ — методом Левіна [11]. Цитозольну фракцію клітин печінки виділяли, згідно з методикою, описаною у посібнику [12]. Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази визначали, згідно з методиками праць [10, 13], вміст білка в отриманих препаратах — методом Лоурі. Математичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням програм статистичного пакета аналізу даних в Microsoft Excel. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували *t*-критерій Стьюдента.

Основним біологічним маркером окисних модифікацій ДНК при канцерогенезі та пухлинному рості є 8-охо-G. Збільшення нагромадження цього продукту спричинює трансверсію азотистих основ ДНК Г : Ц → Т : А. Внаслідок окисного пошкодження гуаніну ДНК формується індукована нестабільність геному, активація протоонкогенів, що є основою ініціації канцерогенезу і розвитку пухлин. У результаті експериментальних та клінічних досліджень хімічного канцерогенезу молочної залози і розвитку пухлин шлунково-кишкового тракту авторами [8] показано підвищення рівня 8-oxod-Gu та 8-охо-G, індукованого супероксидними радикал-іонами. За даними експериментальних досліджень було встановлено, що при експериментальній моделі раку товстого кишечника, індукованого ДМГ, швидкість

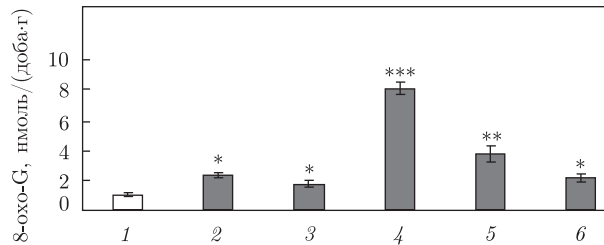


Рис. 1. Швидкість нагромадження 8-охо-G у сечі щурів при ДМГ-індукованому колоректальному канцерогенезі та при сумісному його застосуванні з МІ-1 ($M \pm m$; $n = 6$). Зірочка (*) — $p < 0,05$; (**) — $p < 0,01$; (***) — $p < 0,001$ відносно контролю.

Зразки: 1 — контроль; 2 — МІ-1 0,027 мг/кг; 3 — МІ-1 2,7 мг/кг; 4 — ДМГ; 5 — ДМГ + МІ-1 0,027 мг/кг; 6 — ДМГ + МІ-1 2,7 мг/кг

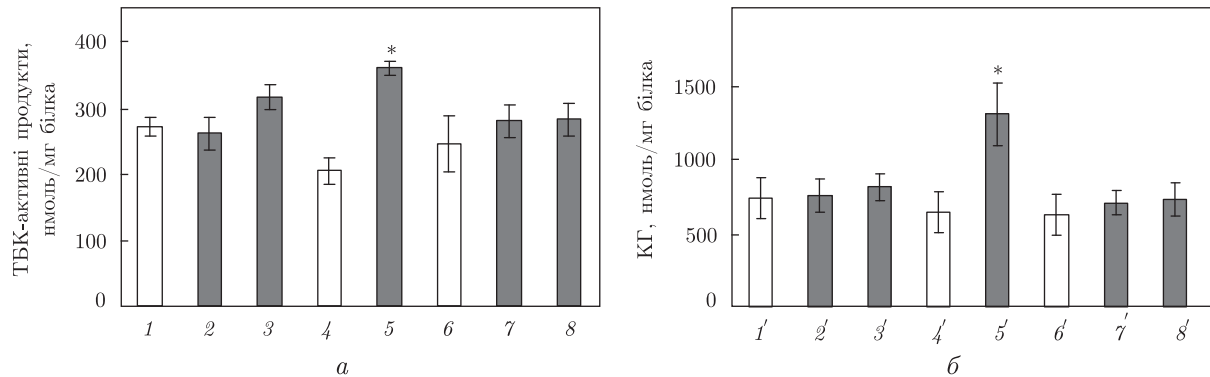


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів (а) і КГ білків (б) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів внаслідок розвитку ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу та при сумісному його застосуванні з МІ-1 ($M \pm m$; $n = 9$). Зірочка (*) — $p < 0,01$ відносно контролю.

Зразки: 1, 1' — К-оля; 2, 2' — МІ-1 0,027 мг/кг; 3, 3' — МІ-1 2,7 мг/кг; 4, 4' — К-фіз. розчин; 5, 5' — ДМГ; 6, 6' — К-оля + фіз. розчин; 7, 7' — ДМГ + МІ-1 0,027 мг/кг; 8, 8' — ДМГ + МІ-1 2,7 мг/кг

нагромадження 8-охо-G у сечі зростає у 8 разів порівняно з контрольною групою (рис. 1), що може свідчити про розвиток канцерогенних процесів. МІ-1 викликає значно менші підвищення швидкості нагромадження 8-охо-G у сечі щурів у 2,3 раза в дозі 0,027 мг/кг і в 1,7 раза в дозі 2,7 мг/кг (див. рис. 1). При канцерогенезі товстого кишечника МІ-1 частково відновлює швидкість нагромадження 8-охо-G, рівень показника є вдвічі меншим у порівнянні з дією самого ДМГ.

Порушення окисного гомеостазу, яке характеризується підвищенням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків на фоні зниження функціональних можливостей антиоксидантної системи, є одним із патогенних факторів виникнення запальних процесів та онкологічних захворювань. Тому нами було визначено основні продукти ПОЛ, окисної модифікації білків і стану антиоксидантної системи при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстого кишечника щурів.

Групи тварин, яким вводили МІ-1, ДМГ та при їх сумісному впливі, порівнювали з відповідною контрольною групою, що відрізнялися способом введення речовин. Усі показники, що досліджували, в інтактній (контрольній) групі щурів дорівнюють значенням контрольної групи, яка отримувала фізіологічний розчин. Встановлено, що МІ-1 у дозах 0,027 та 2,7 мг/кг не викликає змін вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 2, а) та карбоніль-

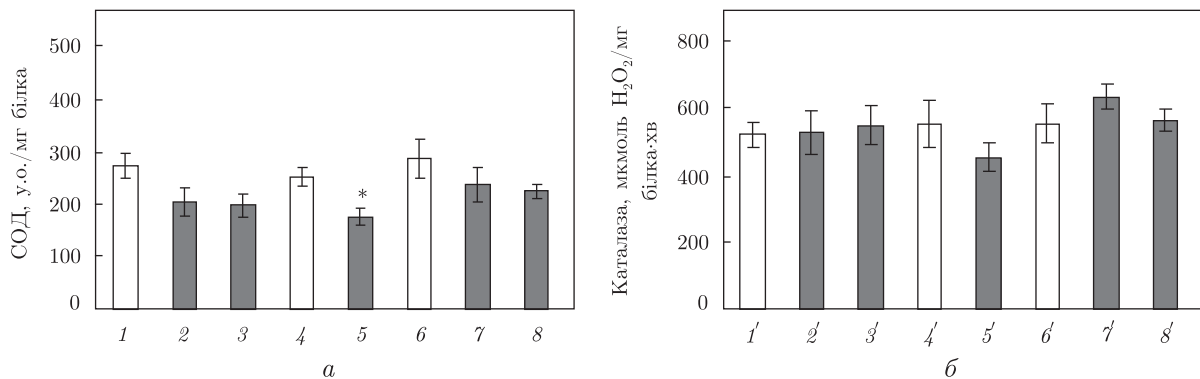


Рис. 3. Активність супероксиддисмутази (а) і каталази (б) у цитозолі гепатоцитів щурів внаслідок розвитку ДМГ-індукованого колоректального канцерогенезу та при сумісному його застосуванні з МІ-1 ($M \pm m$; $n = 9$). Зірочка (*) — $p < 0,05$ відносно контролю.

Зразки: 1, 1' — К-олія; 2, 2' — МІ-1 0,027 мг/кг; 3, 3' — МІ-1 2,7 мг/кг; 4, 4' — К-фіз. розчин; 5, 5' — ДМГ; 6, 6' — К-олія + фіз. розчин; 7, 7' — ДМГ + МІ-1 0,027 мг/кг; 8, 8' — ДМГ + МІ-1 2,7 мг/кг

них груп (КГ) білків в ПМ клітин печінки (див. рис. 2, б). Активність каталази за даних умов не змінювалась (рис. 3, б), але спостерігалась тенденція до пригнічення активності СОД на 25% ($p < 0,1$) порівняно з контрольними значеннями (див. рис. 3, а). Отримані нами результати аналогічні попереднім результатам, наведеним у статті [14], згідно з якими при десятиденному введенні МІ-1 активність СОД печінки щурів знижувалася в 1,8 раза, а активність каталази залишалася на рівні контрольних значень. Було зареєстровано зниження активності СОД під впливом МІ-1, що очевидно, зумовлене не дією токсичних перекисних продуктів, оскільки вміст ТБК-активних продуктів, КГ білків й активність каталази не змінюються, а зумовлене іншими факторами. Так, експресія Cu/Zn-СОД в умовах оксидативного стресу знаходиться під регуляторним контролем сигнального кіназного каскаду РІЗК/Акт, а він, у свою чергу, тісно пов'язаний з активацією низки мембранних тирозин-кіназних рецепторів, зокрема інсулінового (INS-R), та рецептора інсуліноподібного фактора росту (IGF1-R) [2], які блокуються мікромолярними концентраціями МІ-1 [15]. Таке пригнічення вказаних рецепторів може бути однією з причин зниження активності СОД при тривалому впливі МІ-1.

Внаслідок розвитку колоректального раку, викликаного ДМГ, вміст ТБК-активних продуктів та КГ білків ПМ клітин печінки підвищується в 1,75 та 2 рази відповідно (див. рис. 2). Активність каталази під впливом ДМГ має тенденцію до зниження на 21%, СОД — на 43% (див. рис. 3). Тобто, за умов розвитку колоректального канцерогенезу порушується рівновага між інтенсивністю дії прооксидантних факторів і потужністю антиоксидантної системи клітин печінки щурів, що призводить до надмірної активації процесів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків.

Підвищення вмісту ТБК-активних продуктів, карбонільних груп білків та зниження активності СОД і каталази встановлено при індукції колоректального канцерогенезу ДМГ також й іншими авторами [6]. Таке порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги призводить до розвитку оксидативного стресу. Загальновідомо, що будь-який патологічний процес відбувається на фоні утворення активних форм кисню та інтенсифікації вільнорадикального окиснення біосубстратів. Активність антиоксидантних ферментів (СОД і каталази) пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і нагромадженням токсичних перекисних продуктів

(перекиси жирних кислот, альдегідів, кетонів тощо), які викликають зниження активності ферментів.

При сумісному застосуванні ДМГ та МІ-1 в обох досліджуваних дозах не зареєстровано вірогідних змін вмісту ТБК-активних продуктів і КГ білків та активності каталази в порівнянні з контролем, на відміну від дії самого ДМГ (див. рис. 2, 3), активність СОД при дії МІ-1 частково пригнічується. Таким чином, отримані дані свідчать, що МІ-1 сприяє нормалізації вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків і активність антиоксидантних ферментів, що порушуються при дії ДМГ.

Роботу виконано за підтримки гранту Президента України для наукових досліджень молодих вчених (№ 336/2008-рп від 16.12.2008 р.).

1. *Blume-Jensen P., Hunter T.* Oncogenic kinase signaling // *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 / Г. Г. Дубиніна, Ю. М. Воловенко. – Заяв. 21.02.2006; Опубл. 24.04.2007.
3. *Дубиніна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін.* Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Журн. орган. та фарм. хімії*. – 2007. – **5**, № 1. – С. 39–49.
4. *Yablonska S., Lynchak O., Filinska O. et al.* Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate // *The FEBS J. – Life's Molecular Interactions: Proc. of the 34th FEBS Congr.* – July 4–9, 2009. – Prague: Czech. Republ., 2009. – P. 352.
5. *Perse M., Cerar A.* The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis // *Radiol. Oncol.* – 2005. – **39**, No 1. – P. 61–70.
6. *Skrzydłewska E., Sulkowski S., Koda M. et al.* Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer // *World J. Gastroen.* – 2005. – **11**, No 3. – P. 403–406.
7. *Тодоров И. Н., Тодоров Г. И.* Мультифакторная природа высокой частоты мутаций мтДНК соматических клеток млекопитающих // *Биохимия*. – 2009. – **74**, вып. 9. – С. 1184–1194.
8. *Бурлака А. П., Сидорук Є. П.* Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – Київ: Наук. думка, 2006. – 227 с.
9. *Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B., Kappas A.* Plasma membranes of the rat liver isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canalliculi // *J. Cell Biol.* – 1969. – **41**, No 1. – P. 124–131.
10. *Артюхов В. Г., Наквасин М. А.* Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2000. – 295 с.
11. *Levine R. L., Garland D., Oliver C. N. et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Method in enzymology*. – 1990. – **186**. – P. 464–47.
12. *Методы биохимических исследований: Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой.* – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
13. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
14. *Філінська О. М., Яблонська С. В., Острівська Г. В. та ін.* Вплив похідного малеїміду на стан антиоксидантної системи печінки щурів за умов оксидативного стресу // *Доп. НАН України*. – 2009. – № 8. – С. 179–183.
15. *Rojo A. I., Salinas M., Martín D. et al.* 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 // *J. Neuroscience*. – 2004. – **24**, No 33. – P. 7324–7334.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 04.12.2009

O. M. Filinska, S. V. Yablonska, O. V. Lynchak, A. P. Burlaka,
G. V. Ostrovska, T. V. Rybalchenko, E. V. Lukyanchuk

The influence of maleimide derivative on the development oxidative stress of liver in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats

The antioxidant system status, content of lipid and protein peroxidation products of liver rat, and the rate of production of DNA oxidative damage molecular marker – 8-oxoG under the influence of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione (MI-1) in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental colon carcinogenesis in rats are studied. MI-1 reduces the changes in the content of TBA-active products and plasma membrane protein carbonyl groups, SOD and catalase activities of rats liver, and the rate of production of DNA oxidative damage molecular marker which are induced by DMH.