

ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ ЗА УМОВ ГАЛЬМУВАННЯ ПУХЛИННОГО РОСТУ

О. Біленко*, М. Руденко, І. Леус, С. Бабій, О. Скорік, Н. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна
e-mail: bilenkoelena@mail.ru*

Вивчено вплив нової кластерної сполуки ренію з феруловою кислотою як органічним лігандом та цисплатину на активність глутатіонпероксидази, глутатіон-трансферази і вміст відновленого глутатіону в крові щурів з модельною карциномою Герена. Отримані дані свідчать про певні зміни в глутатіонзалежній системі крові при гальмуванні пухлинного росту досліджуваними сполуками. При канцерогенезі ефект дії змішаної наноліпосомної системи реній-платина виражений більше, ніж при окремому введенні досліджуваних речовин. Показано, що, поряд з ефективною протипухлинною дією, в даній групі відзначається підвищення рівня глутатіону й активності глутатіонпероксидази, при зниженні активності глутатіон-S-трансферази. Зроблено висновок, що, на відміну від одноразового введення цисплатину, введення системи реній-платина сприяло підвищенню антиоксидантного потенціалу організму та стабілізації досліджуваних показників.

Ключові слова: глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза, цисплатин, система реній-платина.

Онкологічні захворювання займають друге місце серед причин смертності населення після серцево-судинних захворювань. Процес розвитку пухлини супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги за участю активних форм кисню, що призводить до активації процесу перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантної системи (АОС) [8, 18]. Антиоксидантні властивості препаратів, у тому числі і протипухлинні, можуть відігравати вирішальну роль у кореляції патологічних станів [8, 19]. Доведено, що активність вільнорадикальних процесів і стан системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в організмі суттєво змінюються при розвитку пухлини. Тому актуальним є вивчення змін у системі антиоксидантного захисту при канцерогенезі і пошук нових протипухлинних сполук із антиоксидантними властивостями. Ключова роль у захисті клітини від окисного стресу належить системі глутатіону. Глутатіон (GSH), глутатіонпероксидаза (GP), глутатіонтрансфераза (GT) і глутатіонредуктаза (GR) утворюють глутатіонову антиоксидантну систему. При виснаженні цієї системи виникають значні пошкодження клітини і, в результаті, розвиток захворювань [13]. Тому дослідження змін показників системи глутатіону є доволі актуальним для пошуку нових фармакологічних засобів, які могли би корегувати стан окисного стресу при розвитку новоутворень.

Кластерні сполуки ренію мають унікальний реакційний центр – $Re\equiv Re$ з окисно-відновними властивостями. Ці сполуки виявляють низьку токсичність, антиоксидантні, гепато- і нефропротекторні властивості на моделях гострого токсичного гепатиту й за канцерогенезу [1, 4, 8]. Введення сполук ренію разом із цисплатином у ліпосомній формі супроводжується вірогідним покращенням загального фізичного стану тварин і корекції системи антиоксидантного захисту крові на рівні відомих антиоксидантів [1, 3, 4, 8]. Отже, метою роботи було дослідити систему глутатіону в моделі пухлинного росту при введенні

нової кластерної сполуки ренію з феруловою кислотою як органічного ліганду окремо й у складі реній-платинової (Re-Pt) системи [11, 17], порівняння отриманих результатів з одноразовим введенням цисплатину (сPt).

Матеріали та методи

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 100–150 г віком два місяці. Суспензія пухлинних клітин (30% у фізіологічному розчині) карциноми Герена (Т8) перещеплювалася здоровим щурам від пухлиноносіїв, отриманих у Інституті онкології та радіології ім. Р. О. Кавецького МОЗ України. Цисплатин, ліпосомні форми кластерних сполук ренію і змішані наноліпосоми сполуки ренію та цисплатину готували в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [16]. Досліджували кластерну сполуку ренію з феруловою кислотою як органічний ліганд (рис. 1).

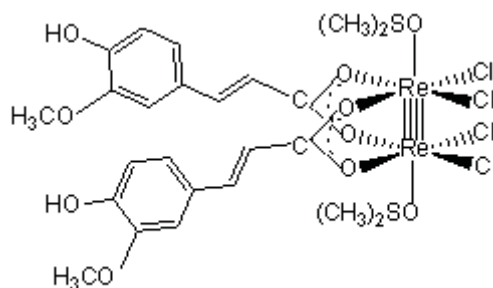


Рис. 1. Структурна форма досліджуваної сполуки $\text{cis-Re}_2(\text{HO-C}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCOO})_2\text{Cl}_4 \times 2(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ – біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -ферулатодиреній (III) або Referul.

Кластерні сполуки ренію і цисплатин вводили різними способами за схемою антиоксидантної терапії [15]. Дослідні тварини були поділені на 6 груп по 8 щурів у кожній:

- 1 – контроль – здорові інтактні щури;
- 2 – Т8 – щури з карциномою Герена;
- 3 – сPt – щури з карциномою Герена Т8, яким вводили цисплатин у дозі 8 мг/кг на 9 добу після трансплантації пухлинних клітин;
- 4 – Referul – щури з карциномою Герена Т8, яким вводили сполуку Ренію у вигляді ліпосом у дозі 7 мкмоль/кг;
- 5 – Referul+сPt – щури з карциномою Герена Т8, яким вводили систему Re-Pt як одноразове введення розчину сPt у дозі 8 мг/кг на 9 добу та сполуку ренію в ліпосомній формі, починаючи з 3 доби після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби, у дозі 7 мкг/кг з кінцевим молярним співвідношенням введених сполук ренію і платини 4:1;
- 6 – [Referul+сPt(4:1)] – щури з карциномою Герена Т8, яким вводили змішані наноліпосоми, навантажені сполукою ренію та цисплатином у молярному співвідношенні 4:1, починаючи з 3-ї доби після трансплантації пухлини із розрахунку 7 мкмоль/кг ренієвої сполуки.

Після декапітації (на 21-шу добу) з використанням анестезії хлороформом, у крові визначали вміст відновленого глутатіону [9], активність глутатіон-S-трансферази [12] та глутатіонпероксидази [5]. Застосовували методи математичної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Глутатіон вносить основний вклад у функціонування системи антиоксидантного захисту [6]. Вміст відновленого глутатіону у крові здорових щурів і щурів із карциномою Герена за умов гальмування пухлинного росту сполукою ренію та цисплатином, представлений на рис. 2.

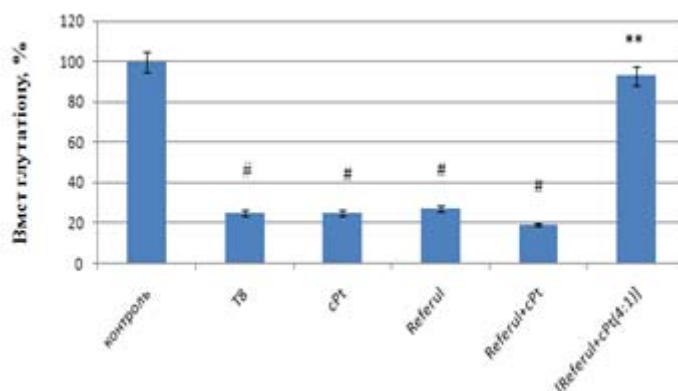


Рис. 2. Вміст глутатіону у крові здорових щурів і щурів із карциномою Герена під впливом досліджуваних сполук, %.* – достовірна різниця порівняно з групою T8, $p < 0,01$; # – достовірна різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$ ($n=8$).

Зменшення концентрації глутатіону у групі T8 на 75%, порівняно з контролем, свідчить про високу інтенсивність процесу ПОЛ і виснаження глутатіонової системи. Низький рівень GSH крові також може призвести до порушення транспорту глутатіону в інших тканинах. Введення цисплатину не призводило до підвищення концентрації глутатіону, що свідчить про виснаження антиоксидантної системи щурів-пухлиноносіїв [14]. Введення Referul та Referul+cPt також не призвело до зміни досліджуваного параметра. Натомість, введення системи [Referul+cPt(4:1)] сприяло підвищенню вмісту глутатіону на 67,3%, порівняно з групою пухлиноносіїв, і рівень GSH майже досягав значень контрольної групи. Тобто інкапсуляція сполуки ренію разом із цисплатином у наноліпосому призводить до модифікації дії обох сполук. Поряд зі значною протипухлинною активністю такої системи, в даному дослідженні показана інтенсифікація антиоксидантних властивостей сполуки ренію. Відомо, що ферулова кислота виявляє антиоксидантні властивості, тому її можна вважати перспективною як ліганд для сполук ренію. Зафіксоване підвищення рівня глутатіону може свідчити про відновлення доступності субстратів (амінокислот) для GSH, що були порушені при розвитку оксидативного стресу [14] у щурів-пухлиноносіїв.

На рис. 3 показано активність глутатіон-S-трансферази у гемолізаті еритроцитів здорових щурів і щурів із карциномою Герена при введенні досліджуваних сполук.

Із літературних джерел відомо, що активність глутатіонтрансферази підвищується при різних онкологічних захворюваннях, і цей показник вважають потенціальним маркером розвитку пухлинного процесу [2, 10]. Встановлено, що активність GT у групі T8 підвищувалася на 49% порівняно з контролем. Введення cPt щурам-пухлиноносійм не змінювало активність ферменту порівняно з групою T8. Відсутність тенденції до зниження рівня даного маркера пухлинного росту впродовж двох тижнів свідчить про недостатність проведеного лікування і можливу подальшу генералізацією пухлинного процесу [13].

Під впливом кластерної сполуки ренію та системи Re-Pt значення активності ферменту досягало показників контрольної групи. Спостерігалось зниження активності

GT у групі Referul – на 59%, Referul+cPt – на 60% і [Referul+cPt(4:1)] – на 47%, порівняно з групою T8. Отже, зниження у крові щурів-пухлиноносіїв активності глутатіонтрансферази при введенні кластерної сполуки ренію окремо та в системі з цисплатином свідчить про ефективність такого лікування, що зумовлює зниження інтенсивності пухлинного росту і нормалізацію АОС [13].

Було визначено також зміни активності глутатіонпероксидази при застосуванні досліджуваних сполук. Результати показано на рис. 4.

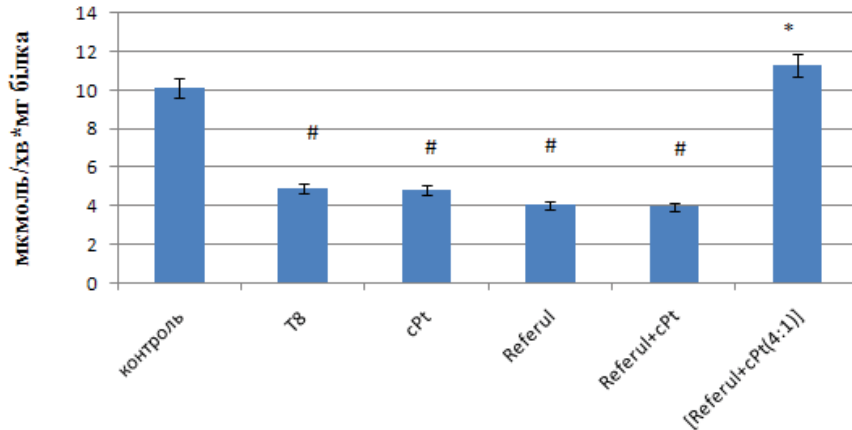


Рис. 3. Активність глутаіон-S-трансферази у гемолізаті еритроцитів здорових щурів і щурів із карциномою Герена під впливом досліджуваних сполук, мкмоль/хв. х гНб; * – достовірна різниця порівняно з групою T8, # – достовірна різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$, $n = 8$.

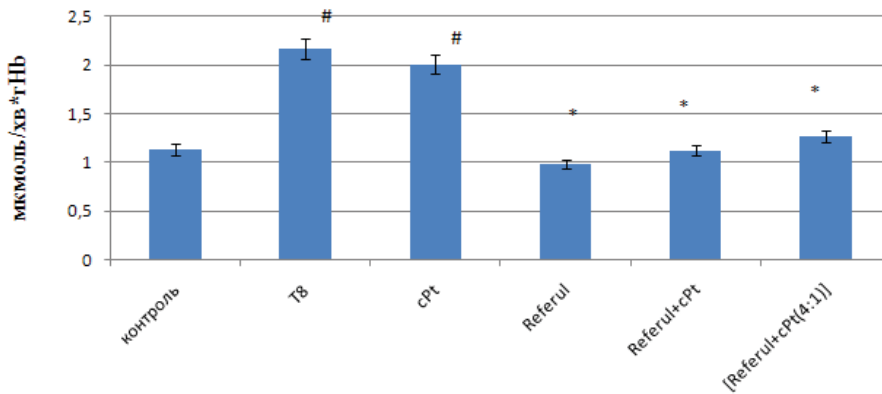


Рис. 4. Активність глутатіонпероксидази у крові здорових щурів і щурів із карциномою Герена під впливом досліджуваних сполук, мкмоль/хв. х мг білка.* – достовірна різниця порівняно з групою T8, # – достовірна різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$, $n = 8$.

Дослідження активності глутатіонпероксидази показало, що її рівень у групі T8 і при введенні цисплатину знижується в середньому на 55%, порівняно з контролем. Подібна тенденція відзначається і в групах Referul та Referul+cPt. Зниження активності GP можна розглядати як нормальну фізіологічну реакцію на інтенсифікацію вільнорадикальних процесів загалом і підвищеної кількості H_2O_2 та/або гідроперекисів в окремих випадках [6]. Глутатіонпероксидаза є одним із найважливіших компонентів антипероксидної ферментної системи клітини, але загалом видаляє невеликі кількості перекису водню, а при його більш

високій концентрації головне навантаження несе каталаза [7]. Під час введення системи [Referul+cPt(4:1)] спостерігалось підвищення активності ферменту на 127% порівняно з групою Т8. Оскільки активність GP безпосередньо залежить від кількості пероксидів у крові, то підвищення її активності свідчить про зниження рівня окисного стресу у крові щурів-пухлиноносців [6].

Отже, встановлено, що ріст пухлини викликає порушення системи АОЗ і призводить до зменшення вмісту глутатіону на 75%, зміни активності ферментів: зниження активності глутатіонпероксидази на 58% та підвищення активності глутатіон-S-трансферази на 49%. Введення цисплатину не призводило до підвищення концентрації глутатіону і нормалізації активності ферментів глутатіонової системи, хоча і зменшувало розміри пухлини. Це свідчить про високу інтенсивність процесу ПОЛ і виснаження глутатіонової системи. Дослідження виявило, що глутатіонова система крові у щурів з модельною карциномою Герена найбільш чутлива до введення змішаних наноліпосом системи Re-Pt. Поряд з ефективною протипухлинною дією, в даній групі відзначається підвищення рівня глутатіону й активності глутатіонпероксидази до показників контрольної групи, а також зниження активності глутатіон-S-трансферази. Отже, можна констатувати, що, на відміну від одноразового введення цисплатину, введення системи [Referul+cPt(4:1)] сприяло підвищенню антиоксидантного потенціалу організму та стабілізації досліджуваних показників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабій С. О., Дьомшина О. О.* Вплив протипухлинної системи «реній-платина» на функціональний стан нирок щурів у моделі токсичної нефропатії // Вісн. пробл. біології і медицини. Полтава, 2010. Вип. 3. С. 94–101.
2. *Васильєва І. Г., Розуменко В. Д., Главацький А. Я.* и др. Полиморфизм глутатіон-S-трансферазы в тканях глиом головного мозга человека и связь его со злокачественностью // Журнал АМН України. 2009. Т. 15. С. 780–788.
3. *Івчук В. В., Полішко Т. М.* Стан печінки щурів при розвитку карциноми Герена та гальмуванні її росту сполуками ренію // Мед. хімія. 2009. Т. 11. С. 60–64.
4. *Івчук В. В., Полішко Т. М.* Вплив протипухлинної системи реній-платина на біохімічний стан печінки // Укр. біохім. журнал. 2011. Т. 83. С. 76–84.
5. *Карпищенко А. И., Смирнов В. В., Глушков С. И.* и др. Методика определения показателей системы глутатиона в лимфоцитах человека // Клиническая лабораторная диагностика. 1997. № 12. С. 41–42.
6. *Коржов В. И., Жадан В. Н.* Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал академії мед. наук України. 2007. Т. 13. С. 3–19.
7. *Кулинский В. И., Колесниченко Л. С.* Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатіонпероксидазы // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. С. 107–122.
8. *Леус І. В., Шамелашвілі К. Л., Скорик О. Д.* Антиоксидантна і протипухлинна активність та механізм дії дикарбоксилатів диренію у тварин із карциномою Герена // Укр. біохім. журнал. 2012. Т. 84. С. 87–96.
9. *Овсянникова Л. М.* Методи оцінки вільнорадикального окиснення та стану антиоксидантної системи організму у клінічній практиці. К.: Вища школа, 2007. 24 с.
10. *Севостьянова Н. В., Чойнзонов Е. Л.* Генетический полиморфизм глутатіон-S-трансферазы у больных плоскоклеточным и мелкоклеточным раком легкого // Рос. онколог. журнал. 2008. № 1. С. 28–32.

11. *Скорик О. Д.* Інтенсивність оксидативного стресу та склад вільних амінокислот крові при гальмуванні росту карциноми Герена сполуками ренію: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. К., 2009. 20 с.
12. *Яблонська С. В., Філінська О. М.* Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на пероксидне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. журнал. 2009. Т. 81. С. 83–92.
13. *Clapper M. L., Szarka C. E.* Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response // *Chem. Biol. Interact.* 1998. P. 111–112. 377–388.
14. *Khynriam D., Prasad S. B.* Hematotoxicity and blood glutathione levels after cisplatin treatment of tumor-bearing mice // *Cell Biol. Toxicol.* 2001. N 17. P. 357–370.
15. *Meerson F. Z., Evstigneeva M. E., Ustinova E. E.* Effect of chronic haemolytic anemia on heart contractile function and increase of its resistance to hypoxia // *Pat. Physiol. and Exp Therap.* 1983. N 5. P. 25–29.
16. *Shtemenko N. I., Berzenina O. V., Yegorova D. E.* et al. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity // *Chem. Biodiversity.* 2008. N 5. P. 1660–1667.
17. *Shtemenko N. I., Zabitskaya E. D., Berzenina O. V.* et al. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity // *Chem. Biodiversity.* 2008. N 5. P. 1660–1667.
18. *Valko M.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. N 39. P. 44–84.
19. *Wondrak G.* Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. N 11. P. 3013–3069.

Стаття: надійшла до редакції 28.01.13

доопрацьована 18.03.13

прийнята до друку 19.03.13

INVESTIGATION OF GLUTATHIONE SYSTEM UNDER INHIBITION OF TUMOR GROWTH

O. Bilenko, M. Rudenko, I. Leus, S. Babiy, O. Skorik, N. Shtemenko

*Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: bilenkoelena@mail.ru*

The influence of new cluster rhenium compound with ferulic acid as the organic ligand and cis-platinum on the activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase and the content of reduced glutathione in rat blood in experimental carcinoma Guerin have been studied. The obtained data demonstrate certain changes in glutathione dependent system of blood under inhibition of tumor growth by research compounds. The effect of the mixed nanoliposome rhenium-platinum system is more pronounced than a single administration of the test substances in cancer. It is shown (in group [Referul+cPt(4:1)]) the effective antitumor activity marked increasing glutathione levels and glutathione peroxidase activity and reducing glutathione-S-transferase activity. It is concluded that, in contrast to a single injection of cisplatin, the introduction of platinum-rhenium system promoted increasing antioxidant capacity of the body and stabilizing the studied parameters.

Keywords: glutathione, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, cisplatin, rhenium-platinum system.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА
ПРИ ТОРМОЖЕНИИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА****Е. Біленко, М. Руденко, І. Леус, С. Бабий, О. Скорик, Н. Штеменко***Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина
e-mail: bilenkoelena@mail.ru*

Изучено влияние нового кластерного соединения рения с ферруловой кислотой в качестве органического лиганда и цисплатина на активность глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы и содержание восстановленного глутатиона в крови крыс с модельной карциномой Герена. Полученные данные свидетельствуют об определенных изменениях в глутатионзависимой системе крови при торможении опухолевого роста исследуемыми соединениями. При канцерогенезе эффект действия смешанной нанолипосомной системы рений-платина выражен больше, чем при отдельном введении исследуемых веществ. Показано, что наряду с эффективным противоопухолевым действием, в данной группе отмечается повышение уровня глутатиона и активности глутатионпероксидазы, при снижении активности глутатион-S-трансферазы. Сделан вывод, что, в отличие от однократного введения цисплатина, введение системы рений-платина способствовало повышению антиоксидантного потенциала организма и стабилизации исследуемых показателей.

Ключевые слова: глутатион, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, цисплатин, система рений-платина.