

О. М. Філінська, С. В. Яблонська, Г. В. Островська,
Т. В. Рибальченко, В. К. Рибальченко

Вплив похідного малеїміду на стан антиоксидантної системи печінки щурів за умов оксидативного стресу

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

Встановлено, що похідне малеїміду — 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон не викликає змін вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (МДА) та окисної модифікації білків (карбонільні групи), а також активності каталази. Похідне малеїміду попереджає стимульовану хлоридом кобальту інтенсифікацію окисних процесів, нормалізуючи при цьому показники до контрольного рівня.

Останнім часом у біології та медицині набуває актуальності розробка нових протипухлинних лікарських препаратів, таких як таргетні [1]. Розвиток багатьох захворювань, зокрема онкологічних, пов'язаний з порушенням протеїнкіназних сигнальних каскадів клітини, які вивчаються з метою дослідження нових протипухлинних засобів, в тому числі і блокаторів протеїнкіназ [2]. Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету ім. Тараса Шевченка синтезовано похідне малеїміду — 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1), що проявляє пригнічувальну дію на низку протеїнкіназ людських клітин, зокрема EGF-R, FGF-R1, IGF1-RINS-R, SRC, SYK, TIE2, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, YES, ZAP70 тощо [3].

На сьогодні встановлено виражену антипроліферативну активність MI-1 на культурах трансформованих і пухлинних клітин, наприклад на культурі клітин нирки ембріона людини лінії HEK 293, клітин лінії карциноми молочної залози MCF-7 [4] і на клітинах раку кишечника SW 620 [5].

Однак вплив малеїміду на одну з основних груп метаболічних процесів живих організмів — окисно-відновні процеси — залишається не вивченим.

Авторами даного повідомлення було досліджено стан антиоксидантної системи, процесів перекисного окиснення ліпідів і білків печінки щурів при дії похідного малеїміду — 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) в умовах розвитку оксидативного стресу, викликаного хлоридом кобальту (II).

Методи та результати досліджень. Досліди проведено на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–300 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію. MI-1 (розчинений у соняшниковій олії) вводили тваринам щоденно перорально — 5 мг/кг, хлорид кобальту (CoCl₂ · 6H₂O) — внутрішньочеревинно — 15 мг/кг, що розчинений у 0,9% NaCl протягом 10 діб. Тварин було поділено на чотири групи: у першій (контрольній) — отримували соняшкову олію та 0,9% NaCl; у другій — MI-1 та 0,9% NaCl; у третій — CoCl₂ та соняшкову олію; у четвертій — MI-1 та CoCl₂. MI-1 вводили за 2 год до введення CoCl₂. Плазматичні мембрани (ПМ) гепатоцитів печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [6]. Цитозоль гепатоцитів печінки щурів виділяли, згідно з методикою, описаною в посібнику [7]. Вміст білка в фракціях визначали методом Лоурі, вміст малонового діальдегіду (МДА) — у ході реакції з тіобарбітуровою кислотою [8],

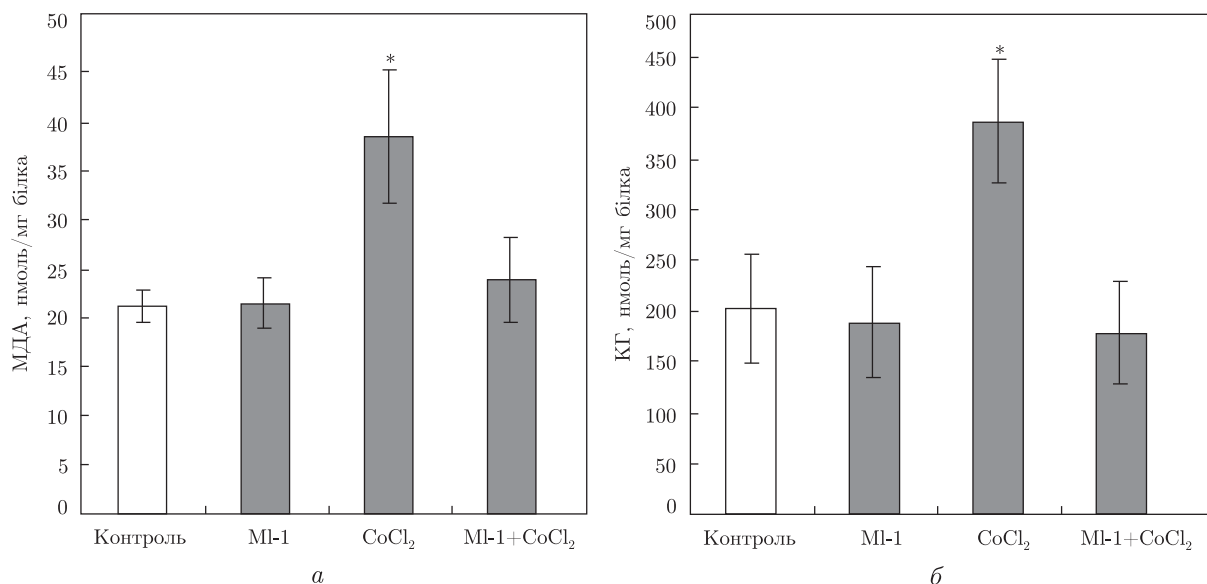


Рис. 1. Вміст малонового діальдегіду (а) та карбонільних груп білків (б) у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні ($M \pm m$; $n = 9$). Зірочка (*) — $p < 0,05$ відносно контролю

а ступінь окисної модифікації білків — методом Левіна [9]. Активність супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1) та каталази (ЕС 1.11.1.6) визначали за результатами робіт [8, 10]. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

Встановлено, що MI-1 не викликає змін вмісту МДА в ПМ порівняно з контрольною групою (рис. 1, а). При дії CoCl₂ рівень МДА зростає в 1,8 разів ($p < 0,05$), що узгоджується з результатами досліджень в публікації [11]: солі важких металів посилюють процеси перекисного окиснення ліпідів на початкових етапах свого впливу на печінку щурів. При сумісному застосуванні MI-1 і CoCl₂ вміст МДА нормалізується до контрольного рівня.

Активні форми кисню, поряд з окисною модифікацією ліпідів, викликають також окисну модифікацію білків, що призводить до порушення конформації білкових молекул: утворюються альдегідні та кетонні групи амінокислотних залишків (карбонільні групи), підвищений рівень яких є показником окиснювального стресу [12]. За нашими даними, MI-1 не впливає на вміст карбонільних груп (КГ) білків у ПМ гепатоцитів (див. рис. 1, б), а CoCl₂ вдвічі збільшує їх вміст порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$), при сумісному застосуванні MI-1 й CoCl₂ ефект хлориду кобальту повністю нівелюється. Відсутність змін вмісту МДА і КГ у ПМ свідчить, що досліджуване нами похідне малеїміду не стимулює окисні процеси, але попереджає стимульовану хлоридом кобальту інтенсифікацію окисних процесів.

При дослідженні активності ключових ферментів антиоксидантного захисту СОД і каталази встановлено, що MI-1 знижує активність СОД у 1,8 раза ($p < 0,005$), а CoCl₂ — у 1,6 раза ($p < 0,02$) порівняно з контрольною групою (рис. 2, а). При сумісному застосуванні MI-1 й CoCl₂ значення цього показника досягає контрольного рівня.

Пригнічення активності СОД хлоридом кобальту може бути наслідком утворення надлишку H₂O₂, зокрема в результаті недостатньої дії каталази, а також нагромадження сполук, які взаємодіють з іонами металів в активному центрі ферменту або впливають на ступінь їх відновлення [13]. Активність СОД пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і нагромадженням токсичних перекисних продуктів (перекиси жирних кислот, альдегідів, кетонів тощо), які

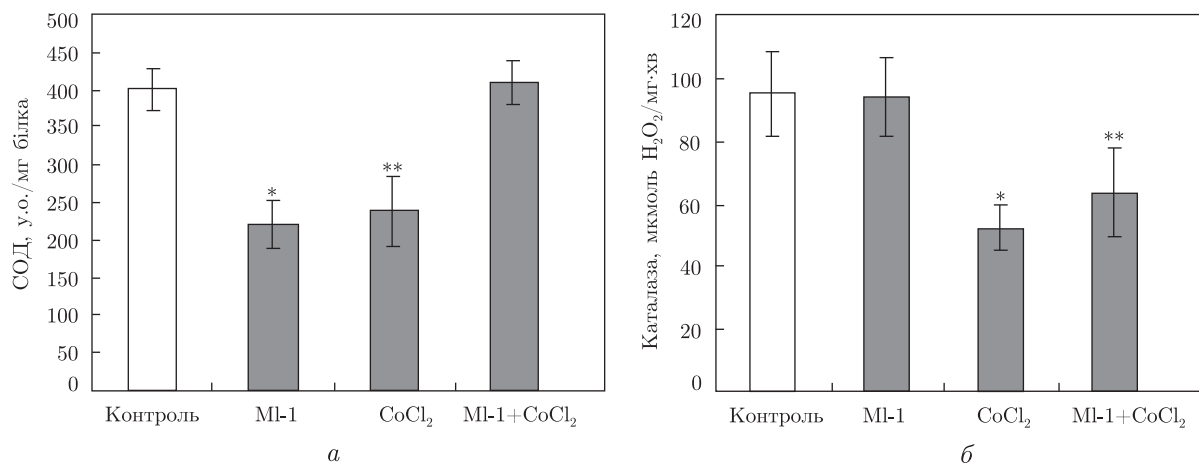


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази (а) та каталази (б) у цитозолі клітин печінки щурів при дії MI-1, CoCl₂ та їх сумісному застосуванні ($M \pm m$; $n = 9$). Зірочка (*) – $p < 0,005$, (**) – $p < 0,02$ відносно контролю

викликають зниження її активності та інших антиоксидантних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази). Отже, зареєстроване нами зниження активності СОД під впливом CoCl₂, очевидно, зумовлене дією токсичних продуктів ПОЛ, яке значно інтенсифікується в печінці тварин (див. рис. 1). Проте, оскільки під впливом MI-1 вміст МДА в ПМ та активність каталази не змінюється (див. рис. 2, б), можна припустити, що в даному випадку пригнічення СОД обумовлене не дією токсичних перекисних продуктів, а іншими чинниками.

Відомо [14], що експресія Cu/Zn-СОД в умовах оксидативного стресу знаходиться під регуляторним контролем сигнального кіназного каскаду РІЗК/Akt, а він, в свою чергу, тісно пов'язаний з активацією низки мембранних кіназних рецепторів, зокрема інсулінового (INS-R) та рецептора інуліноподібного фактора росту (IGF1-R), які, за нашими попередніми даними, блокуються мікромолярними концентраціями MI-1. Таке пригнічення вказаних рецепторів може бути однією з причин зниженої активності СОД при тривалому впливі MI-1.

Похідне малеїміду не викликає значних змін активності каталази в цитозолі гепатоцитів (див. рис. 2, б), тоді як CoCl₂ знижує активність ферменту на 45% ($p < 0,001$). При сумісному застосуванні MI-1 з CoCl₂ активність каталази частково відновлюється.

Внаслідок розвитку оксидативного стресу під впливом CoCl₂ спостерігається порушення рівноваги між продуктами перекисного окиснення та системою антиоксидантного захисту в бік зростання рівня МДА та КГ та зменшення активності антиоксидантної системи (СОД та каталази). Прооксидантна роль кобальту за цих умов пов'язана з його здатністю безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню та пероксидом водню, активувати ферментні системи генерації реактивних форм кисню, індукувати синтез протизапальних цитокінів [15]. MI-1 не викликає змін вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, а навпаки, нормалізує вміст МДА та КГ до контрольного рівня при сумісному застосуванні з CoCl₂ (див. рис. 1, 2). Досліджувана речовина не впливає на активність каталази, але знижує вдвічі активність СОД. При сумісному застосуванні MI-1 з хлоридом кобальту активність ферменту відновлюється до контрольного рівня. Оскільки під впливом MI-1 вміст МДА та КГ у ПМ не змінюється, то зумовлене ним зниження активності СОД не може бути пов'язане з порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Такий ефект можна пояснити через інгібуючу

дію MI-1 на рецепторні протеїнкінази, що призводить до пригнічення експресії гена білка СОД [14].

Таким чином, за умов експериментального оксидативного стресу порушується прооксидантно-антиоксидантна рівновага у бік нагромадження продуктів перекисного окиснення ліпідів — МДА та окисної модифікації білків — КГ. MI-1 нормалізує вміст продуктів ПОЛ та окисної модифікації білків та сприяє відновленню активності ключових ферментів антиоксидантного захисту.

Роботу виконано за підтримки гранту Президента України для наукових досліджень молодих вчених.

1. Dubinina G. G., Chupryna O. O., Platonov M. O. et al. In silico design of protein kinase inhibitors: successes and failures // *Anticancer agents med. chem.* – 2007. – **7**, No 2. – P. 171–188.
2. Pande V., Ramos M. J., Gago F. The protein kinase inhibitor balanol: structure-activity relationships and structure-based computational studies // *Ibid.* – 2008. – No 6. – P. 638–645.
3. Pat. 22204 UA. Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / G. G. Dubinina, Yu. M. Volovenko. – Publ. 21.02.2006. – Appl. U200601855.25.04.2007.
4. Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G. et al. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // *Biochemistry of cell regulation: 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conf.* – Athens, Greece, 2008. – P. 348.
5. Дубініна 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.
6. 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 canaliculi // *J. Cell Biol.* – 1969. – **41**, No 1. – P. 124–131.
7. *Методы биохимических исследований* / Под ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с. – [Науч. пособие].
8. Артюхов В. Г., Наквасина М. А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2000. – 296 с.
9. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Methods in Enzymology.* – 1990. – **186**. – P. 464–478.
10. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. Sunderman F. W., Zaharia O. Hepatic lipid peroxidation in CoCl₂-treated rats, evidenced by elevated concentrations of thiobarbituric acid chromogens // *Res. com. chem. pathol. pharmacol.* – 1988. – **59**, No 1. – P. 69–78.
12. Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левицкий Е. Л. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // *Совр. пробл. токсикологии.* – 2005. – № 3. – С. 20–26.
13. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. Биологическая роль супероксидсмутазы // *Укр. біохім. журн.* – 1989. – **61**, № 2. – С. 14–27.
14. 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. Neurosci.* – 2004. – **24** (**33**). – P. 7324–7334.
15. Gueniche A., Viac J., Lizard G. Effect of various metals on intercellular adhesion molecule – 1 expression and tumour necrosis factor alpha production by normal human keratinocytes // *Arch. Dermatol. Res.* – 1994. – **286**, No 8. – P. 466–470.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка*

Надійшло до редакції 26.01.2009

O. M. Filinska, S. V. Yablonska, G. V. Ostrovska, T. V. Rybalchenko,
V. K. Rybalchenko

**The influence of maleimide derivative on a condition of the rat liver
antioxidant system under oxidative stress**

The maleimide derivative (MI-1) — 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione does not cause changes in the content of lipid peroxidation products (malonic dialdehyde) and oxidatively modified proteins (carbonyl groups) and catalase activity. MI-1 prevents an intensification of the oxidative stress caused by cobalt chloride and recovers these parameters to the control value.