

УДК 576.32/36:57.044

О. І. Доценко, канд. хім. наук, доц.,
О. О. Драгущенко,
В. А. Доценко

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРООКСИДАНТНОЇ ТА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ СИСТЕМ Cu^{2+} — AscH , Cu^{2+} — AscH — O-PHENANTHROLINE

Донецький національний університет

Вступ

Здатність активних форм кисню (АФК) ефективно окиснювати нуклеїнові кислоти і білки та виявляти тим самим цитотоксичну дію запропоновано використовувати у протипухлинній терапії. В останні роки як нові протипухлинні препарати запропоновані бінарні каталітичні системи, що включають органокомплекси перехідних металів у комбінації з аскорбіновою кислотою. Вважають [1; 2], що компоненти таких систем можуть селективно нагромаджуватися в пухлинах і генерувати вільні радикали, що спричинюють загибель клітин.

Таким чином, метою роботи було дослідження цитотоксичності прооксидантних систем, здатних генерувати перекис водню. У зв'язку з тим, що в еритроцитах певний рівень H_2O_2 визначається співвідношенням активностей ферментів супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази, порушення редокс-балансу клітин оцінювали за змінами активності цих ферментів в умовах окисного стресу, спричиненого спільною присутністю іонів міді, аскорбінової кислоти та хелатуючого агента о-фенантроліну.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували периферичну кров практично здорових донорів однієї статі та приблизно одного віку.

Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням із Na-фосфатним буфером (0,015 моль, рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl (буферний розчин 1). Відмиті від плазми й упаковані еритроцити ресуспендували у цьому ж буфері. Еритроцити інкубували протягом 5 год при 25 °С у окисних середовищах наступного складу: система 1 — аскорбінова кислота (AscH) $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, Cu^{2+} — $5,3 \times 10^{-6}$ моль/л, буфер 1; система 2, крім компонентів середовища 1, містила о-фенантролін (o-phen) у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Кількість еритроцитів у середовищі інкубування підтримували на рівні, відповідному вмісту гемоглобіну 2,1–2,6 мг/мл. Через певні інтервали часу проби відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (рН 7,4), після чого відмиті еритроцити ресуспендували у вихідному об'ємі буфера 1.

Активність ферментів антирадикального захисту (АРЗ) визначали у гемолізатах еритроцитів. Гемоліз проводили на хо-

лоді протягом 10 хв після додавання до аліквоти суспензії 0,01%-го розчину сапоніну в 0,01 М Na-K-фосфатному буфері (рН 7,4). Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1.) визначали за методом [3] та розраховували за відсотком гальмування реакції автоокиснення кверцетину, зарахованому до кількості гемоглобіну у пробі (мг).

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за утилізацією перекису водню (H_2O_2). Кількість H_2O_2 визначали за допомогою Fox-реактиву [4]. За активність ферменту брали кількість мікромоль субстрату (H_2O_2), перетвореного ферментом за одиницю часу (хв), розрахованого на 1 мг гемоглобіну (Hb) у пробі. Загальну каталазну активність визначали у гемолізатах еритроцитів, а активність мембранозв'язаної каталази — з використанням інтактних клітин. Оцінку вмісту перекису водню у системах Cu^{2+} — AscH , Cu^{2+} — AscH — o-phen, у середовищі інкубування та в еритроцитах оцінювали також за допомогою Fox-реактиву.

Активність глутатіонпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.9) визначали за методом [5] і виражали в мікромольях окисненого

відновленого глутатіону (GSH) на 1 мг Hb за 1 хв.

Вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали геміглобінціанідним уніфікованим методом.

Вплив окисного середовища вищезазначеного складу досліджувався не менше ніж у трьох повторях експерименту. При побудові залежностей, що будуть наведені нижче, використовувалися усереднені дані. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили в програмі Statistica.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження системи Cu^{2+} — AscH показало, що вміст H_2O_2 збільшується з часом і досягає $(43,69 \pm 1,05)$ мкмоль/л через 5 год від початку реакції. У системі 1 проокисантна роль AscH описується реакцією відновлення Cu^{2+} до Cu^+ у водному середовищі з константою швидкості $3,5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Іони Cu^+ можуть брати участь у реакціях Габера — Вейсса і Фентона (константа швидкості $4,7 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, тимчасом як для аналогічної системи з Fe^{2+} — $76 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), що приводить до утворення АФК, зокрема гідроксил-радикалів ($\bullet\text{OH}$) і регенерації іонів Cu^{2+} . Теоретично подібний цикл може тривати нескінченно.

Введення в систему Cu^{2+} — AscH о-фенантроліну в 2–2,5 рази збільшує вміст H_2O_2 у системі протягом першої години реакції порівняно з системою Cu^{2+} — AscH. Потім продукція H_2O_2 знижується, однак залишається вищою, ніж у системі Cu^{2+} — AscH. Показано [6], що в умовах надлишку о-фенантроліну й у присутності аскорбату як відновника іони міді утворюють переважно комплекси складу $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, які мають унікальну властивість каталізувати реакції окиснення молекулярним киснем. Механізм реакції включає координацію субстрату, що окиснюється, і кисню в аксіальних положеннях комплексу металу з проміжним утворенням потрібного комплексу. При цьому полегшується активація молекулярного кисню та прискорюється реакція окиснення. Очевидно, що нагромадження H_2O_2 у системі AscH — Cu^{2+} — о-phen прискорюється наявністю каталізатора, а лімітується кількістю субстрату реакції, тобто аскорбінової кислоти, що нами і зареєстровано.

Таким чином, у розчині досліджувані системи дійсно дуже ефективно генерують АФК. Далі простежимо, чи так ефективно ці системи генерують АФК усередині клітини.

Отримані залежності динаміки генерації внутрішньоклі-

тинного H_2O_2 (рис. 1, а) свідчать про те, що внутрішньоклітинний окисний стрес розвивається через 15–20 хв після внесення еритроцитів у системи 1 і 2. Цей стрес зумовлений в основному потоком у клітину перекису водню, що утворюється в середовищі інкубування. На це вказує: по-перше, зниження концентрації H_2O_2 у позаклітинному середовищі (рис. 1, б), по-друге, низький рівень активності СОД, що каталізує реакцію дисмутації супероксиданіон-радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) з утворенням H_2O_2 (рис. 2, а, б, залежність 1) і досить високий рівень активності каталази (див. рис. 2, а, б, залежність 2). Через 30 хв вміст внутрішньоклітинного перекису водню стрімко знижується до контрольного рівня (див. рис. 1, а), а у системі 2 стає навіть нижчим за контроль. За часом різке падіння вмісту внутрішньоклітинного H_2O_2 збігається зі стрімким ростом активності ГП (рис. 3, б), що відіграє значну роль у нейтралізації перекису водню й адаптації клітин до дії стрес-фактора. Зі збільшенням часу інкубування еритроцитів у системах 1 і 2 динаміка внутрішньоклітинного та позаклітинного нагромадження H_2O_2 суттєво відрізняється, у зв'язку з чим ці системи згодом обговорюватимуться окремо.

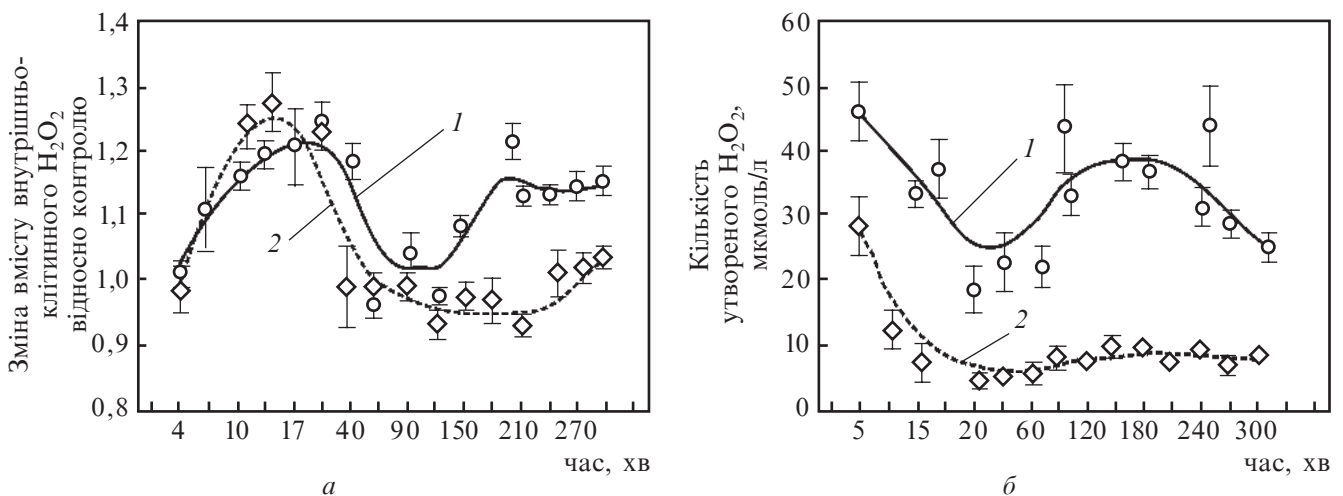


Рис. 1. Динаміка нагромадження H_2O_2 у внутрішньоклітинному (а) та позаклітинному (б) середовищах під дією систем AscH — Cu^{2+} (1) і AscH — Cu^{2+} — о-phen (2)

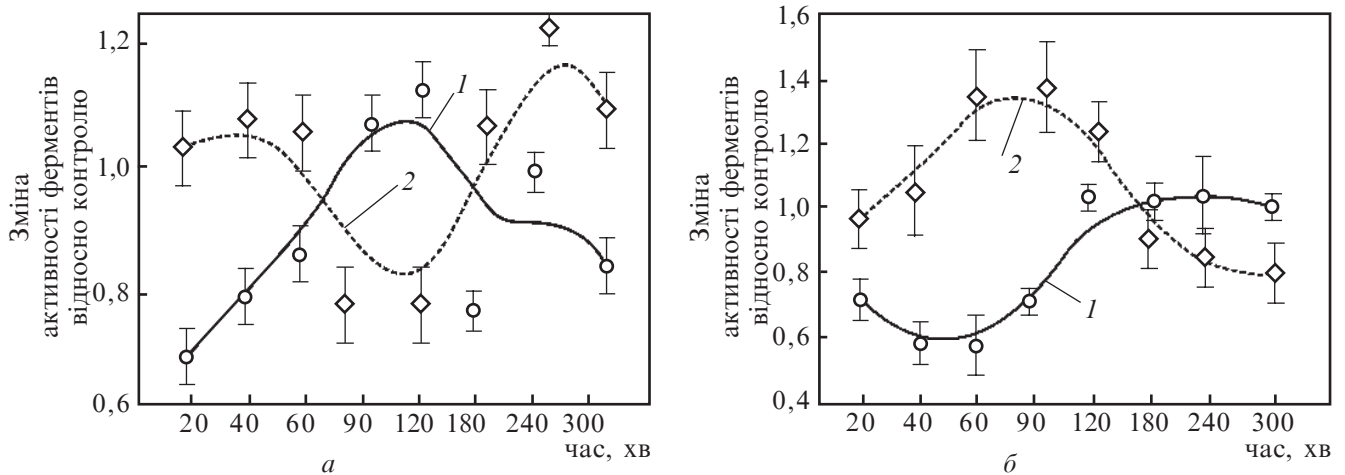


Рис. 2. Протифазна зміна активностей СОД (1) і мембранно-зв'язаної каталази (2) в системах: а — AscH — Cu²⁺, б — AscH — Cu²⁺ — o-phen

Через 150 хв від початку експерименту в еритроцитах, що знаходилися під впливом системи 1, знову реєструється окисний стрес. Це вказує на зниження здатності редокс-системи клітин стримувати потік екзогенного перекису водню, хоча за рівнем ендogenous АФК, близьких до контролю, еритроцити ще не пошкоджені. Слід зазначити, що зміна активності СОД має високу вірогідну зворотну кореляцію з внутрішньоклітинним вмістом H₂O₂ (r = -0,72) та позитивну (r = 0,75) із вмістом H₂O₂ у середовищі інкубування. Порівнюючи зміну активностей СОД і каталази в системі AscH — Cu²⁺ легко помітити, що активності мембранно-зв'язаної каталази та СОД змінюються протифазно (див. рис. 2,

а). Відомо, що для багатьох ферментів, у тому числі й для супероксиддисмутази й каталази, характерне явище перехресної регуляції активності. Для каталази супероксидний аніон-радикал є негативним ефектором, а H₂O₂ позитивним, для СОД — навпаки.

Цитотоксична дія системи AscH — Cu²⁺ перш за все знаходить своє відображення в інактивації цитоплазматичної фракції каталази, що впливає на загальну каталазну активність еритроцитів. Протягом 90 хв активність цитоплазматичної каталази еритроцитів системи 1 знижується на (60,0±14,7) %, а в кінці експерименту це падіння становило (80,6±8,6) % (див. рис. 3, а). Відомо [7], що цитоплазматична каталаза бере без-

посередню участь у процесах окиснення гемоглобіну. Істотне зниження її активності вказує на стан гострої клітинної гіпоксії. Існує думка про те, що відновлення перекису водню може служити додатковим джерелом молекулярного кисню. Розкладання H₂O₂ до O₂ і води в каталазній або пероксидазній реакції відбувається з викидом вільної енергії електронів, кінцевим акцептором яких є молекулярний O₂, що використовується у легенях на окиснення гемоглобіну або дифундує в плазмі для компенсації гіпоксії в тканинах.

В еритроцитах, що інкубувалися у системі 2, через 1 год від початку експерименту кількість внутрішньоклітинного перекису не змінюється й утриму-

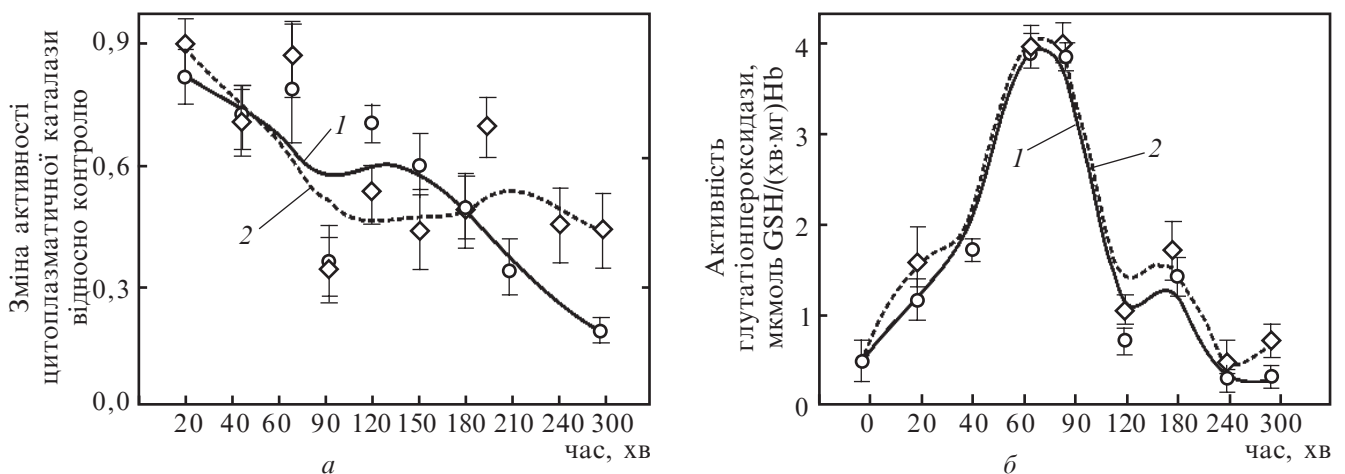


Рис. 3. Зміна активності: а — цитоплазматичної каталази відносно контролю в системах AscH — Cu²⁺ (1) і AscH — Cu²⁺ — o-phen (2), б — глутатіонпероксидази в системах AscH — Cu²⁺ (1) і AscH — Cu²⁺ — o-phen (2)

ється на рівні контролю. Вміст H_2O_2 в середовищі інкубування клітин також швидко знижується і через 20 хв практично не визначається, тобто система 2 не спричинює утворення АФК ані у клітинах, ані у зовнішньому розчині.

Використання о-фенантроліну як хелатуючого агента у багатьох роботах ґрунтується на застарілому уявленні про те, що о-фенантролін та інші комплексоутворювачі здатні транспортувати іони металів у цитоплазму клітин і генерувати АФК так, як у розчині. Друга помилка базується на тому, що цитоплазма клітини за фізичними якостями не відрізняється від позаклітинного середовища, тому реакції, які можуть відбуватися в звичайному розчині, також можуть протікати усередині клітини, якщо всі вихідні компоненти туди будуть доставлені. Але цитоплазма клітини — це гель, що має дуже низьку розчинність для багатьох сполук, а речовини, які б мали якості транспортерів металів усередину клітини, досі не знайдені (це стосується також валіноміцину, який утворює комплекси з іоном калію) [8].

Оскільки всі компоненти системи $AscH - Cu^{2+} - o\text{-phen}$ додавалися до системи послідовно, то спочатку деяка кількість Cu^{2+} реагувала з $AscH$ з утворенням АФК, внаслідок того що константа швидкості реакції досить висока, тобто для іони Cu^{2+} могли увійти до комплексу з $o\text{-phen}$, потрібен деякий час. Комплекси $Cu(o\text{-phen})^+$, $Cu(o\text{-phen})_2$, зв'язуючись із клітинною мембраною, втрачають можливість каталізувати про-

цеси окиснення, тому що для цього потрібно скоординувати субстрат і молекулярний кисень. Тому генерація H_2O_2 усередині еритроцитів на початку експерименту зумовлена поточком екзогенного перекису водню, що утворюється за рахунок взаємодії іонів Cu^{2+} з $AscH$, а зменшення її кількості — роботою ферментів АОЗ — мембранно-зв'язаної каталази (див. рис. 2, б) і глутатіонпероксидази (див. рис. 3, б). Середнє падіння цитоплазматичної каталазної активності протягом останніх двох годин експерименту становило $(48,0 \pm 12,9) \%$, що менше, ніж у системі 1 (див. рис. 3, а).

У міру того, як комплекси $Cu^{2+} - o\text{-phen}$ зв'язуються з мембраною еритроцитів, генерація перекису водню в позаклітинному середовищі припиняється, а у внутрішньоклітинному встановлюється на рівні контролю. Таким чином, система $AscH - Cu^{2+} - o\text{-phen}$ не може розглядатися як система, що ініціює нагромадження АФК усередині клітин. В основі цитотоксичної дії цієї системи лежить інший механізм.

Висновки

1. Показано, що система $AscH - Cu^{2+}$ має прооксидантні властивості. Екзогенний окисний стрес, зумовлений утворенням АФК у результаті взаємодії іонів Cu^{2+} з $AscH$, спричинює внутрішньоклітинний окисний стрес, який з часом призводить до порушення редокс-балансу еритроцитів.

2. Система $AscH - Cu^{2+} - o\text{-phen}$ втрачає свої прооксидантні властивості через сорбцію комплексів $Cu^{2+} - o\text{-phen}$ мембраною еритроцитів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Борисенкова С. А. Механизмы окисления аскорбиновой кислоты и проблемы каталитической (темновой) терапии рака / С. А. Борисенкова, Е. Г. Гиренко, О. Л. Каляя // Российский химический журнал. — 1998. — Т. 42, № 5. — С. 111-115.

2. Copper- and Arene-Catalyzed Cleavage of DNA / O. A. Koval, E. G. Boguslavsky, S. B. Oleinikova [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2003. — Vol. 29, N 6. — P. 574-580.

3. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопросы медицинской химии. — 1990. — № 2. — С. 88-91.

4. Ou P. Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in presence of aminotriazole: role of transition metals and relevance to diabetes / P. Ou, S. P. Wolf // Biochem. J. — 1994. — Vol. 303. — P. 935-940.

5. Разыграев А. В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / А. В. Разыграев, А. В. Арутюнян // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 6. — С. 14-16.

6. Скибида И. П. Каталитические системы на основе комплексов $Cu(I)$ и $Cu(II)$ как модели оксидаз и оксигеназ в реакциях окисления молекулярным кислородом / И. П. Скибида, А. М. Сахаров // Российский химический журнал. — 1995. — № 1. — С. 14-31.

7. Сторожук П. Г. Ферменты прямой и косвенной антиоксидантной защиты эритроцитов и их роль в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток / П. Г. Сторожук // Вестник интенсивной терапии. — 2003. — № 3. — С. 8-13.

8. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция / Г. Линг. — СПб.: Наука, 2008. — 376 с.

УДК 576.32/36:57.044

О. І. Доценко, О. О. Драгушченко, В. А. Доценко
ДОСЛІДЖЕННЯ ПРООКСИДАНТНОЇ ТА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ СИСТЕМ $Cu^{2+} - AscH$, $Cu^{2+} - AscH - O\text{-PHENANTHROLINE}$

Досліджено прооксидантну та цитотоксичну дію систем $Cu^{2+} - AscH$ і $Cu^{2+} - AscH - o\text{-phen}$, здатних генерувати перекис водню.

Ключові слова: прооксидантна дія, цитотоксична дія, системи $Cu^{2+} - AscH$, $Cu^{2+} - AscH - o\text{-phenantroline}$.

UDC 576.32/36:57.044

O. I. Dotsenko, O. O. Dragushchenko, V. A. Dotsenko
INVESTIGATION OF THE PROOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTION OF $Cu^{2+} - AscH$, $Cu^{2+} - AscH - O\text{-PHENANTHROLINE}$ SYSTEMS

The prooxidant and cytotoxic action of the systems $Cu^{2+} - AscH$ and $Cu^{2+} - AscH - o\text{-phen}$ which are capable to generate hydrogen peroxide was investigated.

Key words: prooxidant action, cytotoxic action, $Cu^{2+} - AscH$, $Cu^{2+} - AscH - o\text{-phenantroline}$ systems.