

А.П. Бурлака
 О.Б. Кучменко
 Д.М. Петухов
 І.І. Ганусевич
 С.М. Лукін
 Є.В. Лук'янчук
 Є.П. Сидорик
 Н.В. Делеменчук
 Г.В. Донченко

Інститут експериментальної
 патології, онкології
 і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького
 НАН України

Інститут біохімії
 ім. О.В. Палладіна
 НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: убіхінон,
 убісеміхінон, матриксні
 металопротеїнази.

МОДИФІКУЮЧА ДІЯ УБІХІНОНУ, КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРА ЙОГО БІОСИНТЕЗУ НА МІТОХОНДРІЇ ТКАНИН ПЕЧІНКИ ТА СЕРЦЯ ЗА УМОВИ ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ

Резюме. Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину (Д) є активація матриксних металопротеїназ, що є причиною посилення деструкції міжклітинного матриксу. При дії Д на організм тварин виявлено пригнічення активності комплексів I, II і IV ланцюга транспорту електронів у мітохондріях, зниження вмісту убісеміхінону. Одночасне застосування Д, препарату убіхінону та комплексу попередників і модулятора біосинтезу убіхінону значно знижує рівні активності матриксних металопротеїназ в тканинах, підвищує вміст убісеміхінону і нормалізує роботу ланцюга транспорту електронів в мітохондріях і, таким чином, суттєво нівелює токсичну дію Д.

В останні роки активно досліджують механізми виникнення дисфункції мітохондрій (М) та її ролі в етіології ряду захворювань, зокрема серцево-судинних і онкологічних. М є основним джерелом активних форм кисню (АФК), а реакція окислення убісеміхінонів молекулярним киснем у мітохондріальному ланцюзі транспорту електронів (ЛТЕ) — одним із основних процесів, що відповідають за генерацію супероксидних аніон-радикалів [1, 2]. Убісеміхінони функціонують як переносники електронів і протонів від комплексів I і II до комплексу III ЛТЕ, та їх рівень може змінюватися залежно від доступності кисню, активності мітохондріальних комплексів та мембранного потенціалу М. Зміни пулу убісеміхінонів є типовими при порушеннях функціонування ЛТЕ в М, і оцінка його рівня дозволяє виявити дисфункцію М [3, 4]. За дисфункції М через редокс-залежні регуляторні механізми відбуваються масштабні порушення багатьох фізіологічних процесів, зокрема посилення деструкції позаклітинного матриксу (ПМ) за рахунок активації протеаз [5]. Процеси руйнування ПМ є складовою патогенезу цілої низки захворювань, у тому числі онкологічних [6]. Ключова роль в протеолізі білків ПМ належить ферментам із родини цинк-залежних ендопептидаз — матриксним металопротеїназам-2 та -9 (ММП-2 та -9, або желатиназам) [7].

Доксорубіцин (Д) є антибіотиком антрациклінового ряду, який широко використовується як протипухлинний агент. Проте терапевтичний ефект Д прямо корелює із дозозалежним проявом токсичності по відношенню до печінки, серця та інших органів [8]. Зростання рівнів АФК в клітинах може призводити до окисного пошкодження ліпідних, білкових молекул, ядерної та мітохондріальної ДНК, що може віді-

гравати основну роль у реалізації кардіотоксичності Д. Показано, що за умов застосування антиоксидантів (наприклад вітаміну Е, убіхінону) може спостерігатися підвищення антинеопластичної активності Д за рахунок зменшення рівнів АФК, продукованих М. Крім того, при застосуванні антиоксидантів зменшувалися інші токсичні ефекти від прийому Д [8–10].

Убіхінон (коензим Q — CoQ) відіграє центральну роль у біоенергетичних процесах у клітині в першу чергу як переносник протонів й електронів у ЛТЕ у внутрішній мембрані М [11, 12]. При порушенні регуляції та рівня біосинтезу CoQ його кількість, що надходить з їжею, не може повністю забезпечити фізіологічні потреби організму ссавців, особливо за умов розвитку чи наявності патологій, що пов'язані із порушенням біоенергетичного обміну організму [11, 12]. Отже, для забезпечення потреб організму в CoQ необхідне додаткове надходження його ззовні у вигляді лікарських препаратів, які ефективно використовуються в терапії широкого спектру захворювань [11, 12]. Проте такий підхід (субстратної активації) має ряд недоліків, а саме: лікувальний курс (100–350 мг/доб протягом 5–6 міс) має високу вартість; після закінчення курсу лікування не спостерігають відновлення та активації ферментних систем ендогенного біосинтезу CoQ, пригнічується ендогенний синтез CoQ, можливо, за рахунок механізму субстрат-ферментного інгібування [11].

Отже, метою роботи було дослідження вмісту та редокс-стану CoQ, активності комплексів I, II і IV ЛТЕ в М і вмісту активних форм ММП-2 та -9 в тканинах печінки і серця шурів за умови введення Д та дії препарату CoQ₁₀, комплексу попередників і модулятора біосинтезу CoQ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У досліджах використовували шурів-самців масою 180–220 г. Тварин було поділено на 4 групи: 1-ша група — контрольні (інтактні) тварини; 2-га — тварини, яким вводили Д; 3-тя — тварини, яким на фоні введення Д вводили α -токоферилацетат, 4-гидроксибензойну кислоту і метіонін (комплекс ЕПМ); 4-та — тварини, яким на фоні введення Д вводили препарат CoQ_{10} (ЗАТ Аквіон, Російська Федерація).

Д (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 2,2 мг/кг маси тіла щоденно протягом 8 діб [13, 14]. Контрольна група шурів отримувала фізіологічний розчин хлориду натрію в такому ж об'ємі. Тварини отримували біологічно активні сполуки перорально протягом 8 діб паралельно із введенням Д. Тварин декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Вміст CoQ визначали за методом, описаним раніше [15]. Оцінку вмісту убісеміхінонів проводили методом ЕПР на комп'ютеризованому спектрометрі PE-1307 [16]. У М печінки визначали активності сукцинат- і NADH-убіхінон-оксидоредуктазних систем відповідно [17, 18] і цитохромоксидазну активність [19]. Білок визначали методом Лоурі [20]. Вміст активних форм ММП-2 та -9 визначали методом зимографії в поліакриламідному гелі [21].

Результати роботи опрацьовано за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані представлено у формі середньої величини зі стандартною похибкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень виявлено, що при введенні тваринам Д вміст CoQ у тканинах печінки зменшується майже у 2 рази порівняно з контролем (табл. 1). При цьому його вміст у М печінки зростає в 1,6 рази, а в М серця — у 2 рази порівняно з контролем. За умови введення разом із Д препарату CoQ_{10} або комплексу ЕПМ спостерігається нормалізація вмісту CoQ у тканинах і М печінки, а також М серця.

Таблиця 1

Вміст CoQ у тканинах і М печінки та М серця тварин при введенні Д та дії препарату CoQ_{10} і комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n = 6$)

Групи тварин	Тканини печінки, мкг/г білка	М печінки, мкг/г білка	М серця, мкг/г білка
Контроль	190,70 \pm 44,24	69,70 \pm 9,41	110,07 \pm 14,38
Д	99,01 \pm 18,46*	114,74 \pm 4,67*	286,60 \pm 37,46*
Д + ЕПМ	207,15 \pm 37,99#	83,85 \pm 13,52#	101,26 \pm 13,23#
Д + CoQ_{10}	176,37 \pm 29,91#	63,02 \pm 2,74#	—

* — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували Д; $p < 0,05$.

Відомо, що безпосереднім учасником взаємодії із субстратними ділянками ЛТЕ є не CoQ , а його напіввідновлена вільнорадикальна форма — убісеміхінон. Оскільки тривалість життя убісеміхінонів досить мала, і вони перетворюються на убіхінон або убіхінол, надлишок CoQ є необхідним для підтримання оптималь-

ної концентрації убісеміхінонів [12]. Результати дослідження редокс-стану CoQ за умови введення тваринам Д наведено на рис. 1. Вміст убісеміхінонів у тканинах печінки і серця при введенні Д знижується відповідно в 2,1 і 2,3 рази порівняно з контролем. Зростання вмісту CoQ у М печінки й серця (див. табл. 1) разом із зниженням рівня убісеміхінонів може свідчити про перехід наявного CoQ у повністю відновлений або окислений стан. За умови введення тваринам разом із Д комплексу ЕПМ і препарату CoQ_{10} відбувається зростання вмісту убісеміхінонів у тканинах печінки і серця порівняно з тваринами, яким вводили тільки Д (див. рис. 1), хоча в тканинах серця показник залишається нижчим за контрольні величини.

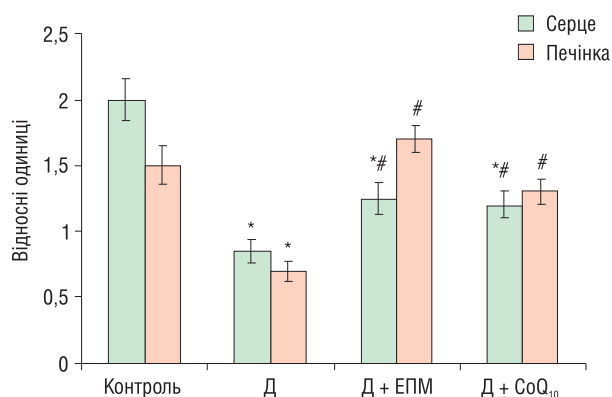


Рис. 1. Вміст убісеміхінонів у тканинах печінки і серця тварин за умови введення Д та дії препарату CoQ_{10} і комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n = 5$); * — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з Д; $p < 0,05$.

Високий рівень убісеміхінонів у тканинах печінки характеризує нормальне функціонування « CoQ -цикла» у М [12]. Зниження їх вмісту може бути пов'язане із порушенням транспорту електронів, що може бути наслідком або зростання окисного стресу, або розвитку механізмів захисту від зростаючої кількості вільних радикалів [4]. Зменшення рівня убісеміхінонів виявляють при ішемії, реперфузії, кардіоміопатіях [3, 4, 22].

За умови введення Д у тканинах серця і печінки достовірно зростає активність ММП-2 та -9 порівняно з контрольними величинами (рис. 2, 3). При введенні тваринам разом з Д препарату CoQ_{10} спостерігають зниження активності обох желатиназ у досліджуваних органах у декілька разів ($p < 0,05$). Комплекс ЕПМ, застосований разом з Д, також призводив до значного достовірного зниження активності ферментів (за винятком ММП-9 у тканинах печінки, вміст активних форм якої зростає майже в 10 разів).

Відомо, що ММП-9 є судинспецифічною желатиназою і відіграє ключову роль в ангиогенезі. Можливо, комплекс ЕПМ, введений разом із Д, через активацію ММП-9 сприяє утворенню нових судин у процесі пристосування організму до хронічної дії токсичного агента.

Показано зворотню кореляцію між рівнями вмісту убісеміхінонів та активних желатиназ у тканинах серця та печінки (за винятком ММП-9 у тканинах печінки).

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ки) (коефіцієнти кореляції $0,33 \div 0,64$; $p < 0,05$). Тобто, при введенні Д відбувається зростання активності желатинази, які, як відомо, регулюються АФК, асоційоване зі зменшенням вмісту убісеміхінонів, яке, у свою чергу, пов'язане із порушенням електронного транспорту. За умови введення разом із Д комплексу ЕПМ та CoQ_{10} , навпаки, відбувається зниження активності ММП-2 та -9, асоційоване із збільшенням вмісту убісеміхінонів у досліджуваних тканинах. Таким чином, зворотня залежність між цими подіями відображає ступінь та направленість розвитку окисного стресу.

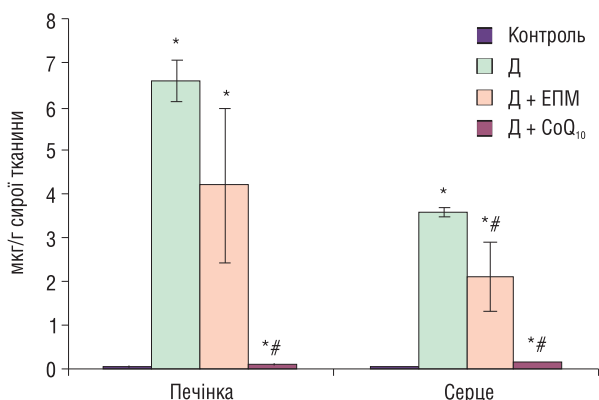


Рис. 2. Активність ММП-2 (концентрація активної форми ферменту) у тканинах печінки та серця тварин при введенні Д та дії комплексу ЕПМ і препарату CoQ_{10} ($M \pm m$, $n = 5$); * — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з Д; $p < 0,05$.

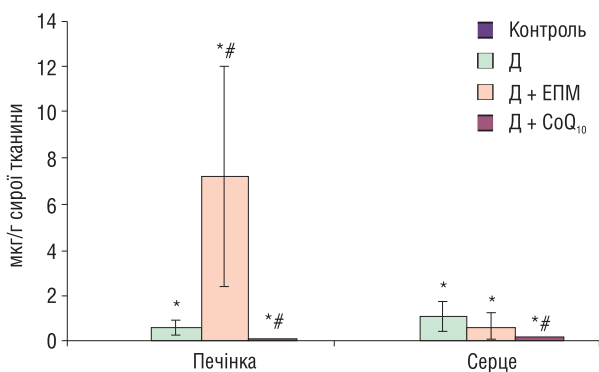


Рис. 3. Активність ММП-9 (концентрація активної форми ферменту) у тканинах печінки та серця тварин при введенні Д та дії комплексу ЕПМ і препарату CoQ_{10} ($M \pm m$, $n = 5$); * — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з Д; $p < 0,05$.

У наших дослідженнях показано зменшення NADH-CoQ-оксидоредуктазної активності в М печінки за умови введення тваринам Д (табл. 2). Зростає відсоток дефіциту CoQ для комплексу I у М печінки. У М серця не відбувається змін активності комплексу I, хоча відсоток дефіциту CoQ зростає, що свідчить про зменшення доступності CoQ для цього комплексу (табл. 3). При застосуванні комплексу ЕПМ відбувається зростання рівня NADH-CoQ-оксидоредуктазної активності в М печінки до контрольних величин; відсоток дефіциту CoQ для цієї ферментної системи зменшується (див. табл. 2) і є навіть дещо нижчим порівняно з контролем. У М серця при введенні комплексу ЕПМ NADH-CoQ-оксидоредуктазна активність не

змінюється, а відсоток дефіциту CoQ зменшується і є меншим за величину в контролі (див. табл. 3).

Таблиця 2

NADH-CoQ-оксидоредуктазна (комплекс I), сукцинат-CoQ-оксидоредуктазна (комплекс II) і цитохромоксидазна (комплекс IV) активність у М печінки тварин за умови введення Д та дії препарату CoQ_{10} і комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Контроль	Д	Д + ЕПМ	Д + CoQ_{10}
Комплекс I, мМ NADH за 1 хв/мг білка	$12,26 \pm 1,41$	$7,45 \pm 1,01^*$	$15,93 \pm 2,42\#$	$12,62 \pm 1,99\#$
Відсоток дефіциту CoQ для комплексу I, %	19,3	39,1	16,7	16,4
Комплекс II, мМ сукцинату за 1 хв/мг білка	$16,38 \pm 0,83$	$12,66 \pm 1,29^*$	$19,71 \pm 2,96\#$	$17,18 \pm 1,28\#$
Відсоток дефіциту CoQ для комплексу II, %	41,8	50,6	45,6	45,9
Комплекс IV, ммоль цитохрому с за 1 год/мг білка	$1,69 \pm 0,26$	$1,18 \pm 0,13^*$	$1,43 \pm 0,04\#$	$1,34 \pm 0,09$

* — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували Д; $p < 0,05$.

Сукцинат-CoQ-оксидоредуктазна активність в М печінки і серця достовірно зменшується при введенні Д. При цьому відсоток дефіциту CoQ для комплексу II як у М печінки, так і в М серця дещо зростає. При застосуванні комплексу ЕПМ відбувається достовірне зростання рівня сукцинат-CoQ-оксидоредуктазної активності в М печінки і серця. Також зменшується відсоток дефіциту CoQ для цієї ферментної системи, хоча ця величина і залишається трохи вищою за контрольні показники (див. табл. 2, 3).

Таблиця 3

NADH-CoQ-оксидоредуктазна (комплекс I), сукцинат-CoQ-оксидоредуктазна (комплекс II) і цитохромоксидазна (комплекс IV) активність в М серця тварин за умови введення Д та комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Контроль	Д	Д + ЕПМ
Комплекс I, мМ NADH за 1 хв/мг білка	$4,86 \pm 0,11$	$5,18 \pm 0,41$	$5,47 \pm 0,42$
Відсоток дефіциту CoQ для комплексу I, %	11,87	21,22	4,93
Комплекс II, мМ сукцинату за 1 хв/мг білка	$14,90 \pm 0,24$	$7,76 \pm 0,87^*$	$26,32 \pm 1,43^*\#$
Відсоток дефіциту CoQ для комплексу II, %	89,76	94,36	87,56
Комплекс IV, ммоль цитохрому с за 1 год/мг білка	$4,97 \pm 0,07$	$3,12 \pm 0,16^*$	$4,01 \pm 0,69$

* — різниця достовірна порівняно з контролем; # — різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували Д; $p < 0,05$.

Показано також зменшення цитохром *c*-оксидазної активності в М печінки і серця за умови введення тваринам Д. Цитохром *c*-оксидаза є термінальною оксидазою ЛТЕ М, у разі порушення функціонування якої блокується транспорт електронів, що порушує мітохондріальне дихання. За умови введення разом із Д комплексу ЕПМ і препарату CoQ_{10} спостерігається зростання цитохром *c*-оксидазної активності в М печінки і серця (див. табл. 2, 3).

Паралельне зниження вмісту убісеміхінонів і цитохром *c*-оксидазної активності та зростання активності желатинази спостерігають як при старінні, ішемії серця, так і при серцевій недостатності, що дозволяє говорити про існування зв'язку між цими двома явищами [4, 23].

Отже, при введенні Д втрачається одна із основних умов нормальної життєдіяльності клітин — спроможність підтримувати гомеостаз редокс-стану, сукупності окисно-відновних компонентів. Дисфункція М, а насамперед, мітохондріальних ферментних комплексів I і III, лежить в основі розвитку окисного стресу та є молекулярним механізмом, що визначає порушення енергетичного обміну, наслідками якого є всі відомі форми гіпоксії та активація протеїназ [2, 5, 23].

При застосуванні комплексу ЕПМ спостерігається захисний ефект на М клітин печінки і серця, про що свідчить відновлення електронного транспорту в дихальному ланцюзі та зниження деструкції ПМ. Досліджуваний комплекс ЕПМ є мітохондріально-тропним та виявляє здатність до відновлення транспорту електронів у дихальному ланцюзі М, пошкоджених Д.

Отримані експериментальні дані можуть лягти в основу розробки підходів корекції токсичних ефектів Д шляхом введення комплексу попередників і модулятора біосинтезу убихінону та обґрунтування застосування комплексу ЕПМ у схемах комплексної терапії онкологічних хворих.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зоров ДБ, Банникова СЮ, Белоусов ВВ и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота. Биохимия 2005; **70** (2): 265–72.
2. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 228 с.
3. Тимошин АА, Цктишвили ОВ, Серебрякова ЛІ, Руге ЭК. Свободнорадикальные центры в ткани миокарда собаки в условиях региональной ишемии. Биофизика 2001; **46** (4): 731–7.
4. Elas M, Bielanska J, Pustelny K, et al. Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy. Free Radical Biol Med 2008; **45**: 321–8.
5. Burlaka A, Ganusevich I, Sidorik E, Osinsky S. Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues. Exp Oncol 2006; **28**: 49–53.
6. Ганусевич ИИ. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. Онкология 2010; **12** (2 (44)): 108–17.
7. Aboukhatwa E. Protease Enzymes and Cancer Metastasis. Breast Cancer 2011; **6** (1): 6–8.
8. Ватутин МТ, Калинкина НВ, Кетинг ЕВ. Антрациклин-новая кардиомиопатия. Донецк: ДонДІШІ, 2001. 236 с.
9. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. Toxicology 2002; **180** (1): 79–95.
10. Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. Circulation 2000; **102** (17): 2105–10.
11. Донченко ГВ. Биохимия убихинона (Q). Киев: Наук думка, 1988. 240 с.
12. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. BBA 2004; **1660** (1–2): 177–99.
13. Капелько ВИ, Хаткевич АН, Дворянцев СН и др. Сократительная функция и энергетический метаболизм сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии. Кардиология 1997; (2): 31–5.
14. Muhammed H, Kupur SKR. Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochem J 1984; **214**: 493–8.

15. Бурлакова ЕБ, Крашаков СА, Храпова НГ. Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран. Биол мембраны 1998; **15** (2): 137–67.

16. Бурлака АП, Данко МЙ, Сидорик ЄП. Кінетичні закономірності швидкості генерування і вмісту радикалів кисню в мембранах ендоплазматичного ретикулуму при хімічному канцерогенезі печінки і молочних залоз. Доп НАНУ 1994; (10): 141–5.

17. Ziegler D, Doeg KA. Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II): Methods in Enzymology. New York 1967; **10**: 231–5.

18. Hatefi Y, Rieske JS. Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain): Methods in Enzymology. New York 1967; **10**: 235–9.

19. Гулидова ГП, Сорокина ИИ. Некоторые условия спектрофотометрического определения активности сукцинат-дегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриях мозга. Булл Эксп Биол Мед 1967; **63** (1): 41–4.

20. Lowry OH, Rosenbrough HJ, Parr AL, Randall RJ. Protein measurement the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; **193** (1): 265–75.

21. De Clerk YA, Perez N, Shimada H, et al. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. Cancer Res 1992; **52**: 701–8.

22. Тимошин АА, Лакомкин ВЛ, Руге ЭК. Влияние ишемического прекодиционирования на свободнорадикальные центры изолированного сердца крысы при ишемии и на ранней стадии реперфузии. Биофизика 2000; **45** (1): 112–8.

23. Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. Free Radiol Biol Med 2004; **37**: 768–84.

MODIFYING EFFECT OF UBIQUINONE, AND COMPLEX OF PRECURSORS AND MODULATOR OF ITS BIOSYNTHESIS ON LIVER' AND HEART' MITOCHONDRIA UNDER DOXORUBICIN TREATMENT

A.P. Burlaka, O.B. Kuchmenko, D.M. Petukhov, I.I. Ganusevich, S.M. Lukin, E.V. Luk'janchuk, E.P. Sidorik, N.V. Delemenchuk, G.V. Donchenko

Summary. The important part of doxorubicin toxicity is an activation of MMPs, which leads to increased destruction of extracellular matrix. The mitochondrial electron-transport chain function was found to be impaired in animals treated with doxorubicin. The decrease in CoQ radical – ubisemiquinone – level was found in organs of animals treated with doxorubicin in therapeutic dosage. The treatment by ubiquinone and complex of precursors of modulator of ubiquinone biosynthesis in parallel to doxorubicin leads to significant decrease in tissue MMPs activities, increase of ubisemiquinone content and normalization of mitochondrial electron-transport chain function, which leads to notable reduction of doxorubicin toxicity.

Key Words: ubiquinone, ubisemiquinone, matrix metalloproteinases.

Адреса для листування:

Кучменко О.Б.

02100, Київ, а/с 148

E-mail: kuchmeb@yahoo.com