

Л.І. Маковецька
О.А. Главін
М.О. Дружина
В.О. Шляховенко
В.М. Михайленко

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

Ключові слова:

АФК-генеруючі системи, макрофаги, супероксидний аніон-радикал, окисний метаболізм, ферменти антиоксидантного захисту.

ВПЛИВ АФК-ГЕНЕРУЮЧИХ СИСТЕМ НА ОКИСНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МИШЕЙ У НОРМІ ТА ЗА ПУХЛИННОГО РОСТУ

Пусковим механізмом порушень окисного метаболізму є дисбаланс генерування активних форм кисню (АФК) у клітинах організму та його регуляція антиоксидантними системами. **Мета:** дослідити вплив АФК-генеруючих систем на окисний метаболізм та протипухлинну активність макрофагів. **Об'єкт і методи:** робота виконана на мишах лінії $C_{57}Bl/6$, яким перещеплювали карциному легені Льюїс. Тваринам вводили разово і фракціоновано АФК-генеруючі препарати (аскорбінова кислота, водорозчинна форма вітаміну К, орнітиновий комплекс міді, фероцену, пероксиду водню). У роботі використано біохімічні, біофізичні, спектрометричні та статистичні методи. **Результати:** досліджувані чинники активують генерацію супероксидного аніон-радикала макрофагами та пригнічують його генерування гепатоцитами. Відмічено зниження каталазної активності як у печінці, так і клітинах пухлини. Проте у крові при дії пар досліджуваних чинників відзначали тенденцію до її активації. **Висновки:** максимальний ефект курсового застосування АФК-генеруючих систем викликає поєднане введення аскорбінової кислоти і міді, що може бути використано для розробки протипухлинних препаратів. Курсове застосування АФК-генеруючих систем (зокрема фероцену та пероксиду водню) порушує окисний метаболізм у клітинах карциному легені Льюїс, що супроводжується зниженням каталазної активності.

ВСТУП

В останні десятиліття дослідження в галузі окисного метаболізму були зосереджені на вивченні генерації вільних радикалів та їх участі у ферментативних і неферментативних реакціях. Після відкриття супероксиддисмутази (СОД) та вивчення її ролі в перебігу окисно-відновних реакцій в організмі виявлено важливу роль кисневих радикалів у цих процесах [1]. Головним джерелом радикальних продуктів у нормально функціонуючих клітинах є реакція одноелектронного відновлення молекулярного кисню з утворенням супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$). Він генерується в процесі функціонування дихального ланцюга мембран мітохондрій, НАДФН-комплексу цитоплазматичної мембрани або мембран ендоплазматичного ретикулу. Крім того, $O_2^{\cdot-}$ утворюється при багатьох інших ферментативних і неферментативних реакціях, ініціюючи утворення низки кисневих радикальних та нерадикальних продуктів, що характеризуються високою реактивністю [2]. Тому вони були об'єднані у групу активних форм кисню (АФК).

Їх роль в організмі може бути як позитивною, так і негативною. АФК є пусковими, ініціюючими чинниками як у формуванні патологічних перетворень в організмі, так і в регуляторних процесах адаптації до дії зовнішніх і внутрішніх впливів. У фагоцитуючих клітинах (зокрема макрофагах — МФ) при контакті з ксенобіотиками активується

процес генерування НАДФН, що зумовлює утворення супероксиду. Інтенсивність цієї реакції характеризує фагоцитарну активність МФ. У гепатоцитах (ГЦ) токсичні речовини детоксикуються, переважно шляхом їх окиснення. Для цього за участю цитохрому P450 активно виробляється $O_2^{\cdot-}$. Надлишки АФК інактивуються ферментними антиоксидантними системами. Фінальний етап контролює каталаза.

Тому метою роботи було дослідження впливу АФК-генеруючих систем на окисний метаболізм та протипухлинну активність МФ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана з використанням мишей лінії $C_{57}Bl/6$ відповідно до вимог Державного комітету з біоетики.

Тваринам дослідної групи вводили внутрішньочеревинно в різних комбінаціях 20 мМ аскорбінової кислоти (АК), 10 мМ водорозчинної форми вітаміну К (ВіК), 10 мМ орнітинового комплексу міді ($Cu(Orn)_2$), 0,2% розчин (0,3 мл) фероцену ($Fe(C_5H_5)_2$), пероксид водню (0,03%). Експерименти проводили через 1 і 24 год після одноразового введення досліджуваних чинників, а також після курсового застосування з введенням цих агентів на 3-тю, 8-му, 26-ту добу після перещеплення карциноми легені Льюїс (КЛЛ) за стандартною методикою. Клітини КЛЛ були одержані з Клітинно-

го банку лінії з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України.

Досліджували прооксидантно-антиоксидантне співвідношення [3] у крові мишей методом індукованої пероксидом водню хемілюмінесценції, каталазну активність [4] у периферичній крові (ПК), печінці та клітинах перещепленої КЛЛ, швидкість генерування супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$) МФ і ГЦ [5], рівень генерування радикалів у тканинах організму за допомогою флуоресцентного зонда діхлорофлуоресцеїндіацетату (DCFDA) [6], сумарну активність ксантиноксидоредуктази (КсОР) та активність дегідрогеназної (КсД, ЕС 1.1.1.204) і оксидазної (КсО, ЕС 1.1.3.22) ізоформ ферменту в МФ, ГЦ і клітинах пухлини визначали за утворенням сечової кислоти із ксантину у модифікації для планшетного рідера з використанням оксонової кислоти для інгібування уреаз [7, 8].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В експериментах *in vitro* досліджували можливість генерації АФК при взаємодії зазначених препаратів (ВіК, $Cu(Orn)_2$, $Fe(C_5H_5)_2$) з АК. Найбільш ефективною АФК-генеруючою парою *in vitro* виявився $Fe(C_5H_5)_2$ у комбінації з АК (табл. 1). Інтенсивність генерації АФК при використанні цієї пари порівняно з іншими (ВіК + АК і $Cu(Orn)_2$ + АК) підвищена у 1,8 та 1,6 рази відповідно та у 5,3 і 2,0 рази за використання цих чинників окремо.

Таблиця 1

Інтенсивність генерації АФК (ум. од.) у 0,05 М PBS буфері (рН 7,4)

АК	ВіК	$Cu(Orn)_2$	$Fe(C_5H_5)_2$	ВіК + АК	$Cu(Orn)_2$ + АК	$Fe(C_5H_5)_2$ + АК
58	21	18	22	65	74	117

Наступним етапом роботи було дослідження впливу АФК-генеруючих систем на окисний метаболізм мишей. При дослідженні швидкості генерування супероксидного аніон-радикала МФ мишей після їх активації АФК-генеруючими препаратами виявлено, що найбільш потужними активаторами МФ виявилися АК та ВіК (рис. 1). Стимулююча дія АК продовжувалася і через 24 год, у той час як ефект ВіК був короткочасним. При поєднаному застосуванні $Fe(C_5H_5)_2$, $Cu(Orn)_2$ та ВіК гальмують стимулюючу дію АК, внаслідок чого швидкість утворення $O_2^{\cdot-}$ МФ зростає повільно. Проведене дослідження свідчить, що, застосовуючи зазначені чинники у різних варіаціях, можна отримувати різний рівень активації МФ, досягаючи експресного максимуму чи пролонгованого ефекту з певною (запрограмованою) швидкістю генерування супероксидного аніон-радикала.

У той же час у ПК мишей відмічено значне зростання каталазної активності — ключового ферменту антиоксидантного захисту — після введення АК як

окремо, так і разом з іншими досліджуваними чинниками (рис. 2). Найбільш ефективними індукторами генерування каталази (у порядку зростання) через 1 год після введення були пари АК + ВіК, АК + $Fe(C_5H_5)_2$ та АК + $Cu(Orn)_2$. Проте через 24 год активність цього ферменту в усіх варіантах досліду (крім тих активуючих факторів, до складу яких входив ВіК) була знижена. Через 24 год каталазна активність після введення ВіК і за поєднаної дії (АК + ВіК) зростала. Вірогідно, введення АК, $Fe(C_5H_5)_2$, $Cu(Orn)_2$ та ВіК порушує прооксидантно-антиоксидантне співвідношення не лише завдяки активації МФ, стимулюючи генерування ними АФК, але і внаслідок утворення АФК АК та її поєднаною дією з металами змінної валентності.

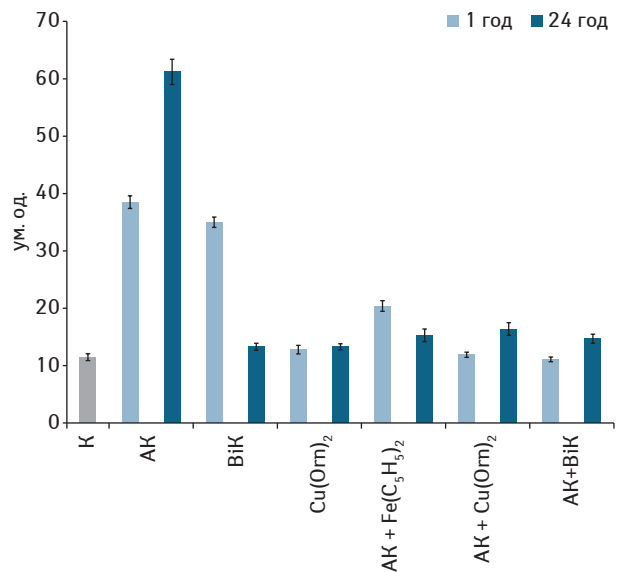


Рис. 1. Швидкість генерування супероксидного аніон-радикала (ум. од.) МФ мишей після їх активації АК, ВіК, $Cu(Orn)_2$, $Fe(C_5H_5)_2$ у 1-шу та 24-ту годину спостереження (К — контроль)

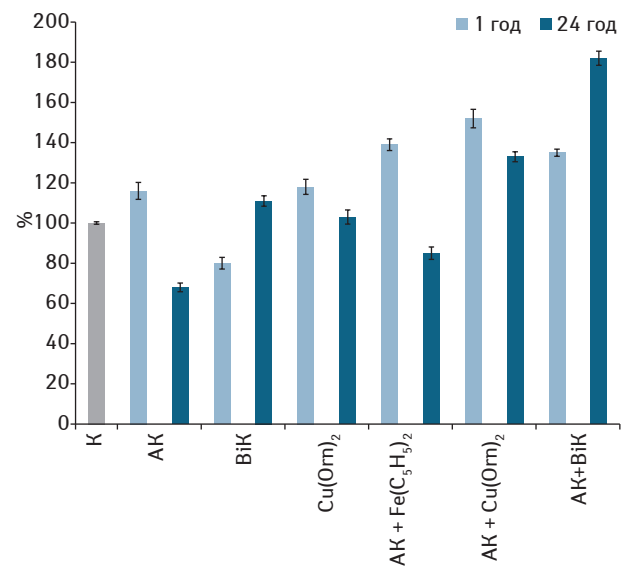


Рис. 2. Каталазна активність (%) ПК мишей після введення АК, ВіК, $Cu(Orn)_2$, $Fe(C_5H_5)_2$ у 1-шу та 24-ту годину спостереження (К — контроль)

Зміни прооксидантно-антиоксидантного співвідношення в крові (рис. 3.) після введення тваринам досліджуваних факторів показали, що у всіх варіантах досліду як через 1 год, так і через 24 год значення цього показника (тест хемілюмінесценції) коливалися нижче контрольного рівня. Це свідчить про активацію систем антиоксидантного захисту і, зокрема, каталази.

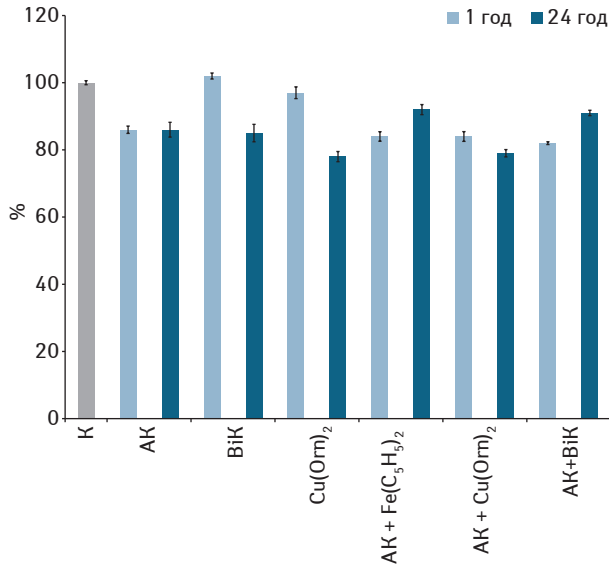


Рис. 3. Рівень прооксидантно-антиоксидантного співвідношення (%) у ПК мишей після введення АК, ВіК, Cu(Orn)₂, Fe(C₅H₅)₂ у 1-шу та 24-гу годину спостереження (К — контроль)

Варто зазначити, що радикал-генеруючі системи (АК + метал змінної валентності чи ВіК) є значно потужнішими стимуляторами каталази, а вірогідно, й інших антиоксидантних ферментів порівняно з їхньою окремою дією.

Відомо, що АК може викликати протилежно спрямовані ефекти: генерувати і перехоплювати АФК, що залежить від умов і навколишніх субстратів. У роботі [10] показано, що АК (0,1 ммоль/л) у системі Фентона (Fe³⁺, ЕДТА, H₂O₂) у 2,8 раза прискорює пероксидне окиснення дезоксирибози. Сенсибілізуючий ефект пов'язують із відновленням АК Fe³⁺ до Fe²⁺. У свою чергу, Fe²⁺ ефективно розкладає H₂O₂ з утворенням ОН-радикалів. Крім цього, виявлено, що в присутності металів змінної валентності за нейтральних і лужних значень рН АК швидко окиснюється з утворенням проміжного продукту — радикала АК. Цей механізм генерування радикала АК із подальшим утворенням ОН-радикала без участі H₂O₂ в модельній системі Fe³⁺ + ЕДТА + АК був продемонстрований у дослідженні [10].

Подальші наші роботи виконано на мишах із КЛЛ. Курсове застосування АФК-генеруючих систем (досліджуваних чинників) різко активує МФ (рис. 4). АК стимулює вироблення O₂⁻ більше ніж у 2 рази (2,6 раза; p ≤ 0,05). Але у парі з Fe(C₅H₅)₂ і Cu(Orn)₂ ефект зростає в 5,8 і 10,5 рази (p ≤ 0,05) відповідно. Це свідчить про можливість використання цього ме-

ханізму активації перитонеальних МФ у протипухлинному опорі організму.

У ГЦ спостерігали дещо іншу ситуацію (див. рис. 4). Відомо, що продукти метаболізму пухлини, потрапляючи до печінки, сприймаються ГЦ як ксенобіотики. Внаслідок цього в таких клітинах активується система детоксикації, що спрямована на нейтралізацію активних шкідливих чинників шляхом їх окиснення. Ключовим фактором цього механізму є генерування на цитохромі Р450 супероксидного аніон-радикала.

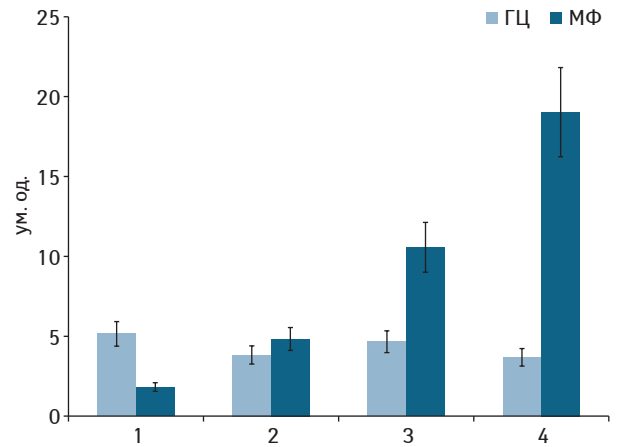


Рис. 4. Швидкість генерування супероксидного аніон-радикала (ум. од.) МФ та ГЦ у ПК мишей із КЛЛ за дії досліджуваних чинників: 1 — контроль; 2 — АК; 3 — АК + Fe(C₅H₅)₂; 4 — АК + Cu(Orn)₂

Курсове застосування АФК-генеруючих інгредієнтів підвищує рівень O₂⁻ та інших активних радикальних продуктів у ПК, що сприяє окисненню шкідливих метаболітів (чи продуктів розпаду) клітин пухлини. Завдяки цьому до клітин печінки, вірогідно, надходять зазначені ксенобіотики зі значно нижчою концентрацією. У результаті ми спостерігали тенденцію до зниження (в 1,1–1,4 раза) вироблення O₂⁻ ГЦ тварин із пухлинами після курсового застосування АФК-генеруючих систем.

Визначення активності ферменту КсОР у клітинах тварин із КЛЛ (рис. 5) показало, що у клітинах печінки активність його за впливу АК та АК + Cu(Orn)₂ достовірно зростала (у 1,28 та 1,33 раза відповідно; p ≤ 0,05) без змін у співвідношенні КсО- та КсД-ізоформ ферменту. У пухлинних клітинах активацію КсОР фіксували як за окремого впливу АК (у 1,21 раза на рівні тенденції), так і у комплексі з Fe(C₅H₅)₂ або Cu(Orn)₂ (у 1,51 раза; p ≤ 0,05). Співвідношення активності КсО- та КсД-ізоформ ферменту, як і у випадку з клітинами печінки, достовірно не змінювалося. Найбільшу активацію КсОР (p ≤ 0,05) при дії АК, АК + Fe(C₅H₅)₂ та АК + Cu(Orn)₂ відзначали у МФ — відповідно у 1,62; 1,85 і 2,13 раза (див. рис. 5). Більшою мірою КсОР представлена КсО-ізоформою. Її активність зростала в 1,23; 1,40 та 1,95 раза за дії АК, АК + Fe(C₅H₅)₂ та АК + Cu(Orn)₂ відповідно (p ≤ 0,05).

Таким чином, відмічено кореляцію між активацією КсОР у МФ (при достовірному (p ≤ 0,05) під-

вищенні активності КсО-ізоформи ферменту) та інтенсивністю генерування супероксидного аніон-радикала.

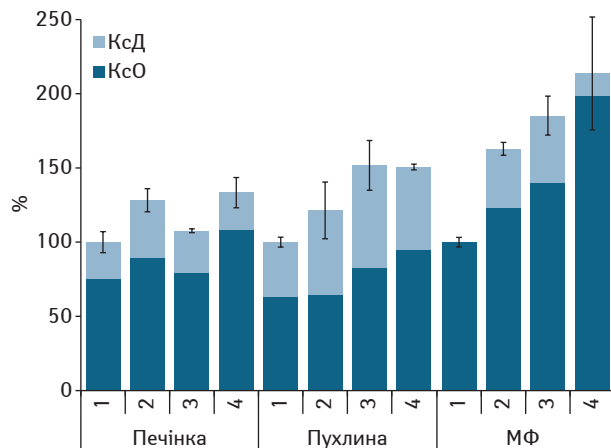


Рис. 5. Активність КсОР у клітинах тварин із КЛЛ за дії досліджуваних чинників: 1 — контроль; 2 — АК; 3 — АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$; 4 — АК + $\text{Cu}(\text{Orn})_2$

Рівень вільнорадикальних продуктів та каталазна активність у печінці та пухлинній тканині (КЛЛ) після курсового застосування інших АФК-генеруючих систем представлено на рис. 6. Суттєвих зрушень балансу вільнорадикальних продуктів у печінці не відмічено, у той час як у клітинах пухлини зареєстровано тенденцію до збільшення їх кількості (в 1,4 раза за дії $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ та в 1,7 раза — за його сумісного з перексидом водню впливу). Показники каталазної активності як у ГЦ, так і у клітинах пухлини були нижче контрольного рівня. При цьому найбільш вираженою дією характеризувалася пара $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (зниження каталазної активності в 1,5 раза у ГЦ та в 1,8 раза — у клітинах пухлини; $p \leq 0,05$). Це свідчить, що при дії досліджуваних факторів на організм з пухлиною відбувається виснаження цієї антиоксидантної системи завдяки надмірній і тривалій активації як метаболітів/продуктів розпаду пухлини, так і АФК-генеруючих систем.

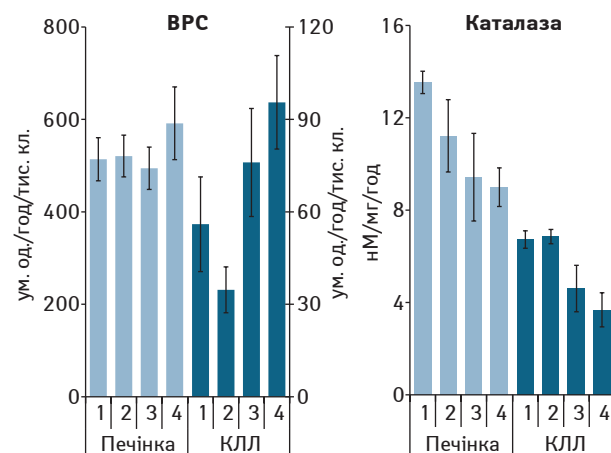


Рис. 6. Рівень вільнорадикальних сполук (BPC) та каталазної активності у клітинах тварин із КЛЛ за дії досліджуваних чинників: 1 — контроль; 2 — H_2O_2 ; 3 — $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$; 4 — $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

ВИСНОВКИ

1. Найбільш потужними активаторами МФ після одноразового введення АФК-генеруючих систем виявилися АК та ВіК. Застосовуючи зазначені засоби впливу у різних варіаціях, можна отримувати різний рівень активації МФ, досягаючи експресного максимуму чи пролонгованого ефекту з певною (запрограмованою) швидкістю генерування супероксидного аніон-радикала.

2. Курсове застосування АФК-генеруючих систем у тварин з КЛЛ також сприяє активації МФ. Максимальний ефект викликає поєднане введення АК і $\text{Cu}(\text{Orn})_2$, що може бути використано для розробки протипухлинних препаратів.

3. Курсове застосування інших АФК-генеруючих систем (зокрема $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ та перексиду водню) порушує окисний метаболізм у клітинах КЛЛ, що супроводжується зниженням каталазної активності.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002198; 2012–2016 pp.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem* 2012; **48** (2): 158–67.
- Бурлака АП, Сидорик ЕП. Редоксзависимые сигнальные молекулы в механизмах опухолевого процесса. К.: Наук думка, 2014. 255 с.
- Серкиз ЯИ, Дружина НА, Хриенко АП и др. Хемилуоменесценция крови при радиационном воздействии. К.: Наук думка, 1989. 176 с.
- Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело* 1988; (1): 16–9.
- Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 1997; **337** (1): 115–20.
- Yao K, Wu W, Wang K, et al. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2008; **19** (14): 964–9.
- Battelli M, Abboudaza A, Stirpe F. Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase. *Chem Biol Interact* 1992; **283** (1): 73–84.
- Wright RM, Ginger LA, Kosila N, et al. Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30** (4): 479–90.
- Лакін ГФ. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990: 352 с.
- Рябенко НИ, Рябенко ВИ, Иванник БП и др. Антиоксидантные и прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты, дигидрохверцетина и мексидола в радикальных реакциях, индуцированных ионизирующим излучением и химическими реагентами. *Радиационная биол. Радиоэкология* 2010; **50** (2): 186–94.

THE INFLUENCE OF ROS-GENERATING SYSTEMS ON OXIDATIVE METABOLISM OF INTACT AND TUMOR BEARING MICE

L.I. Makovetska, O.A. Glavin, M.O. Druzhyna, V.O. Shlyakhovenko, V.M. Mikhailenko

Summary. An imbalance of reactive oxygen species (ROS) generation in cells and deregulation of antioxidant systems is the trigger of oxidative metabolism dis-

orders in organism. **Objective:** to investigate the effect of ROS-generating systems on oxidative metabolism and antitumor activity of macrophages. **Object and methods:** the study was conducted on the C₅₇Bl/6 mice with Lewis lung carcinoma. The animals were treated with single or fractionated ROS-generating agents (ascorbic acid, vitamin K, ornithine copper complex, ferrocene, hydrogen peroxide). We used biochemical, biophysical, spectrometric and statistical methods. **Results:** studying factors activate the generation of superoxide anion radical by macrophages and inhibit its production by hepatocytes. The reduction of catalase activity in the liver and tumor cells was observed. However, in the blood we detected a tendency to its activation after treatment with pairs of investigated factors. **Conclusions:** the maximum effect of a course use of ROS-generating systems reported after combined administration of ascorbic acid and cop-

per that can be used for the development of anticancer drugs. Course use of ROS-generating systems (in particular ferrocene, and hydrogen peroxide) violated oxidative metabolism in the Lewis lung carcinoma cells, which is accompanied by a decrease in catalase activity.

Key Words: ROS-generating system, macrophages, superoxide anion radical, oxidative metabolism, antioxidant defense enzymes.

Адреса для листування:

Маковецька Л.І.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: tsgun@ukr.net

Одержано: 06.12.2016