

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.277.3:615.246.9-616-066-092.4

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАТИНЫ НА АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМНЫХ NADPH-ОКСИДОРЕДУКТАЗ

И.А. ЩЕПЕТКИН¹, В.М. ПЛОТНИКОВ¹, В.Т. КАГИЯ²

¹Институт онкологии Томского научного центра СО РАМН, 634001 Томск,
Кооперативный пер., 5, факс: (8322) 224-097;
e-mail: oncology@info.tsu.ru

²Фонд исследования здоровья, Киото, Япония;
e-mail: t-kagiya@ra2.so-net.or.jp

Спектрофотометрическими и люминометрическими методами исследовано влияние производных платины, цисплатина (цис-дихлородиаминоплатина) и имидазолплатина (цис-диимидазолплатины), на активность микросомных NADPH-оксидоредуктаз печени крыс *in vitro*. Цисплатин в концентрациях от 1 до 12 мкМ, дозозависимо ингибировал цитохром *c*-редуктазную активность и NADPH/люцигенин-зависимую хемилюминесценцию микросом. Снижение NADPH-цитохром *c*-редуктазной активности на 50% наблюдалось при концентрации цисплатина 3 мкМ. Саназол (препарат АК-2123) в концентрациях менее 2,5 мМ не предотвращал ингибирование цисплатином активности микросомных NADPH-зависимых редуктаз. Имидазолплатин в концентрациях до 10 мкМ ингибировал незначительно NADPH-цитохром *c*-редуктазную активность микросом (<1% от уровня контроля). Заключается, что слабое ингибирующее влияние имидазолплатина на микросомные NADPH-оксидоредуктазы позволяет рассматривать это производное платины как перспективное соединение для дальнейших экспериментальных исследований в качестве противоопухолевого препарата со сниженным токсическим действием на нормальные ткани организма.

Ключевые слова: цисплатин, производные платины, NADPH-зависимые редуктазы, микросомы, хемилюминесценция, саназол

ВВЕДЕНИЕ. Производные двухвалентной платины широко используются в онкологии в качестве химиотерапевтических агентов. Одним из наиболее исследованных соединений этого класса является цисплатин. Этот препарат высокоэффективен для лечения опухолей различной локализации и гистогенеза [1]. Широкое применение препарата ограничивается его высокой токсичностью, которая обычно проявляется в виде тошноты, рвоты и нарушения функции почек; реже наблюдается гемо-, ото- и нейротоксичность [2]. Цисплатин является препаратом сравнения по отношению к другим производным платины, синтез которых связан с поиском соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью и меньшим побочным влиянием. Основной механизм противоопухолевого действия цисплатина обусловлен образованием аддуктов цисплатины с ДНК, последующей фрагментацией ДНК и апоптозом [3]. Побочное влияние цисплатина объясняется не только нарушением процессов репликации и транскрипции в нормальных клетках организма [4], но и нарушением функционирования митохондрий в результате подавления I и IV комплексов дыхательной цепи, снижения активности глутатионредуктазы, связывания глутатиона, увеличения образования активных форм кислорода и активации перекисного окисления липидов [5]. Для исследования влияния цисплатина на продукцию активных форм кислорода в биологических системах ранее было использовано несколько методических подходов. В частности, установлено снижение NADH/люцигенин-зависимой хемилюминесценции гомогената почки крысы в присутствии цисплатина, что, по мнению авторов, свидетельствует о ингибирующем действии препарата на продукцию $O_2^{\cdot -}$ [6]. Тем не менее, данный метод регистрации с использованием в качестве доноров электронов NADH или NADPH отражает не базальную продукцию $O_2^{\cdot -}$ в тканевом гомогенате, а активность NAD(P)H-зависимых редуктаз и, по-видимому, диоксигеназную активность цитохрома P450 [7, 8]. Поэтому, обнаруженное снижение NADH/люцигенин-зависимой хемилюминесценции гомогената почки [6] связано, очевидно, с подавлением цисплатином активности NADH-зависимых редуктаз. Действительно, цисплатин ингибирует NADH-зависимую убихинон-редуктазную активность I комплекса дыхательной цепи митохондрий [5]. Однако, влияние цисплатина и других производных платины на активность микросомных NADPH-редуктаз остается не исследованным. Синтезированные ранее имидазолплатиновые соединения характеризуются достаточно высокой противоопухолевой активностью и низкой общей токсичностью [9]. В связи с этим, целью настоящей работы являлось сравнительное изучение влияния производных платины, цисплатина и имидазолплатина, на активность микросомных NADPH-оксидоредуктаз печени крыс *in vitro*.

МЕТОДИКА. В работе использовались цитохром c из сердца лошади, ЭДТА и соли для буферного раствора фирмы "Sigma" (США); люцигенин (2-N-метилакридина нитрат), NADPH, NADH, диметилсульфоксид и глицерин фирмы "Serva" (Германия); фенobarбитал натрия фирмы "Merck" (Германия). Натрий-фосфатный буфер (0,1 М, pH 7,4) готовился на бидистиллированной воде. В маточном растворе люцигенина (600 мкМ) содержался диметилсульфоксид (2,3 об.%). Цисплатин (цис-дихлородиаминоплатина) и имидазолплатин (цис-диимидазолил платины) были синтезированы в научно-исследовательском институте биоорганической химии СО РАН (г. Новосибирск). Саназол (препарат АК-2123; N-(2'-метоксиэтил)-2-[3"-нитро-1"-триазалил]ацетамид) был предоставлен для совместных исследований Фондом исследования здоровья

(Киото, Япония). Растворы препаратов платины и саназола готовились на буфере. В эксперименте были использованы беспородные белые крысы (самцы, 180-230 г). Для повышения в микросомах активности цитохрома P450 (2B) животным внутрибрюшинно вводили фенобарбитал натрия. Введение животным фенобарбитала натрия и последующее выделение микросом из гомогената перфузированной печени было выполнено как описано ранее [8].

Концентрацию микросомного белка определяли биуретовым методом.

Цитохром с-редуктазную активность микросом измеряли спектрофотометрически на приборе Specord M-40 ("Carl Zeiss", Германия) при температуре 25°. Реакционная среда содержала микросомы (30 мкг белка/мл), NADPH (50 мкМ), один из производных платины (1-90 мкМ) и цитохром с (20 мкМ).

Хемилюминетрические исследования проводили на люминометре 1251 ("LKB", Швеция), работающем в автоматическом режиме [8]. Для стандартного измерения в люминетрическую кювету вносили 650 мкл буфера, 50 мкл суспензии микросом (до конечной концентрации белка 30 мкг/мл), 100 мкл раствора одного из производных платины (или 100 мкл буфера в контрольную кювету) и 100 мкл раствора люцигенина (до конечной концентрации 60 мкМ). После запуска программы измерения и подачи образца в кюветное отделение в пробирку добавляли 100 мкл раствора NADPH (до конечной концентрации 50 мкМ). Измерения проводили при 25° при непрерывном перемешивании. Результаты оценивали по интегральным (светосумма за 15 мин) значениям хемилюминесценции.

Каждое воздействие исследовалось не менее чем в трех отдельных опытах. При построении графиков использовались усредненные величины, определенные из трех-пяти измерений. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Добавление цисплатина в среду, содержащую микросомы, NADPH и цитохром с вызывает снижение скорости восстановления цитохрома с, которое со временем прогрессирует. Наибольшее падение скорости происходит за первые 1-3 мин реакции (в зависимости от концентрации цисплатины). Преинкубация микросом с цисплатином в течение 3-5 мин и последующее добавление в среду NADPH и цитохрома с не меняет скорости восстановления цитохрома с по сравнению с образцом в котором цисплатин вводился в реакционную смесь непосредственно перед регистрацией (рис. 1). Проведение реакции в буфере с 1-5 мМ ЭДТА не предотвращает ингибирования ферментативной активности цисплатином (результат не показан). После полного подавления цисплатином NADPH-цитохром с-редуктазной активности, добавление в среду инкубации NADH возобновляет восстановление цитохрома с. В то же время, повторное добавление NADPH (рис. 1) и/или цитохрома с не вызывает повышения скорости реакции ($p > 0.05$). Эти результаты свидетельствуют в пользу предположения, что цисплатин является необратимым ингибитором микросомных фермент(а)ов с NADPH-цитохром с-редуктазной активностью (см. [10]).

Известно, что цисплатин имеет высокую аффинность к SH-группам [11]. Возможно, что механизм ингибирующего влияния цисплатина на NADPH-цитохром с-редуктазную активность микросом обусловлен одноэлектронным восстановлением соединения и последующим связыванием радикалов цисплатина

с нуклеофильными SH-группами фермент(а)ов. В результате этой реакции может образовываться «полуискусственная» электрон-транспортная ферментативная система со сниженной активностью восстановления субстратов (см. [12]).

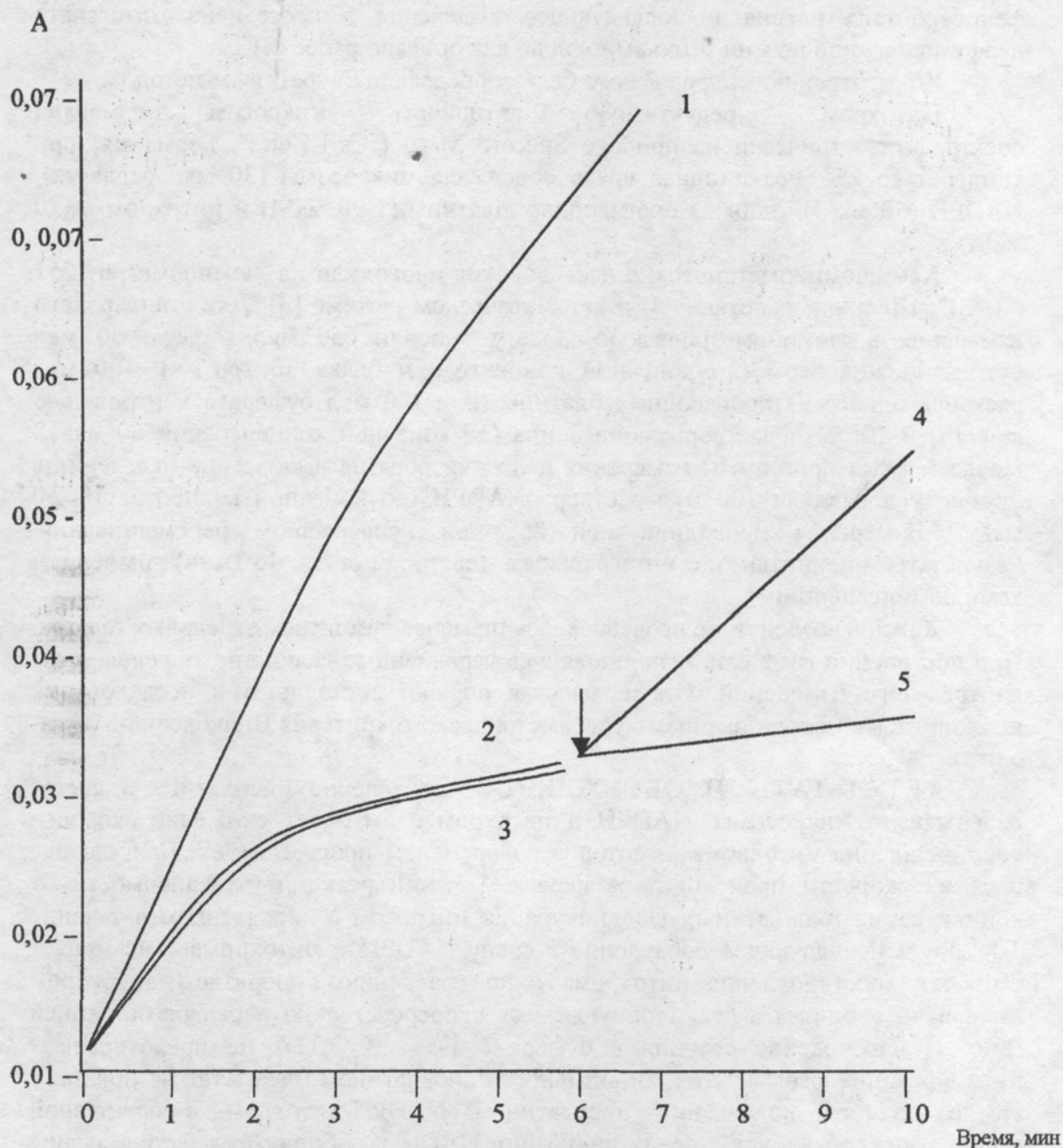


Рисунок 1.

Кинетика восстановления цитохрома с микросомами без (1) и в присутствии 3 мкМ цисплатина (2-5). Цитохром с и NADPH добавлялись сразу после введения в суспензию микросом цисплатина (2) или после 5 мин прединкубации микросом с цисплатином (3). На 6 мин регистрации в образец 2 были добавлены NADH (50 мкМ) (4) или NADPH (50 мкМ) (5). По оси абсцисс - время, мин; по оси ординат - поглощение света реакционной средой при 550 нм.

Зависимость NADPH-цитохром *c*-редуктазной активности от концентрации цисплатина имеет форму сигмоидной кривой (рис. 2). При содержании микросомного белка 30 мкг/мл, цисплатин в концентрации 3 мкМ подавляет ферментативную активность на 50%, а в концентрации 20 мкМ и выше активность падает более чем на 80%. Имидазолплатин при концентрации до 10 мкМ ингибирует ферментативную активность не более чем на 1%, а при концентрации 90 мкМ активность снижается на ~40%.

Сходные результаты получены при исследовании влияния производных платины на NADPH/люцигенин-зависимую хемилюминесценцию микросом. При концентрации цисплатина более 50 мкМ наблюдается почти полное подавление хемилюминесценции. Имидазолплатин также тормозит интенсивность NADPH/люцигенин-зависимой хемилюминесценции микросом. Ингибирующее действие этого соединения на хемилюминесценцию значительно меньшее (рис. 2). Графики зависимостей NADPH-цитохром *c*-редуктазной активности и NADPH/люцигенин-зависимой хемилюминесценции микросом от концентрации цисплатина отражают, по-видимому, титрование SH-групп, функционально значимых для активности NADPH-зависимых редуктаз и имеющих разную скорость реагирования с лигандом (см. [13]). Однако, для более однозначных выводов о роли взаимодействия производных платины с SH-группами микросомных NADPH-зависимых редуктаз в подавлении их ферментативной активности необходимо проведение специальных экспериментальных исследований.

По данным Зханг с соавт. [6], цисплатин в концентрации 2 мМ ингибирует NADH/люцигенин-зависимую хемилюминесценцию гомогената почек крысы на 70%. Эта концентрация очень высокая и не достигается при клиническом использовании препарата. Сообщается, что через 6 ч после введения пациентам цисплатина в дозе 80 мг/м² концентрация препарата в плазме составляет 10 мкМ [14]. После окончания курса химиотерапии концентрация цисплатина в плазме и тканях организма (в том числе почек) может быть значительно более высокой, но, по-видимому, она не превышает 50 мкМ [5, 15]. NAD(P)H/люцигенин-зависимая хемилюминесценция микросом отражает NAD(P)H/люцигенин-редуктазную активность этой субклеточной фракции [8, 16]. Таким образом, уже при концентрации 10 мкМ цисплатин может подавлять активность микросомных NADPH-зависимых редуктаз более чем на 50%. Ингибирующее действие на активность этих ферментов имидазолплатина при концентрации до 10 мкМ значительно меньше (<8%).

Один из способов снижения общей токсичности цисплатина заключается во введении в организм препаратов, содержащих тиоловые группы, связывающих активный цисплатин [17]. Нами было предположено, что другой метод снижения токсичности может состоять в применении соединений, конкурирующих с цисплатином за электроны в ходе восстановления NAD(P)H-зависимыми редуктазами, но не подавляющих активность этих ферментов. Саназол, обладающий радио- и хемосенсибилизирующими свойствами, одноэлектронно восстанавливается микросомными NAD(P)H-зависимыми редуктазами и не снижает их активность [16, 18-20]. Добавление саназола в среду, содержащую микросомы, цитохром *c*, NADPH и цисплатин уменьшает ингибирующее действие цисплатина на NADPH-цитохром *c*-редуктазную активность. Тем не менее, достоверное ($p < 0,01$) "протекторное" действие саназола проявляется только при 2,5 мМ и выше (рис. 3), концентрациях не являющихся терапевтическими для

этого препарата. Возможно, что саназол действительно вытесняет цисплатин из активного центра микросомных NADPH-зависимых редуктаз, однако, образующиеся радикалы саназола способны восстанавливать цисплатин, обуславливая его биоактивацию и конъюгацию с нуклеофильными группами ферментов.

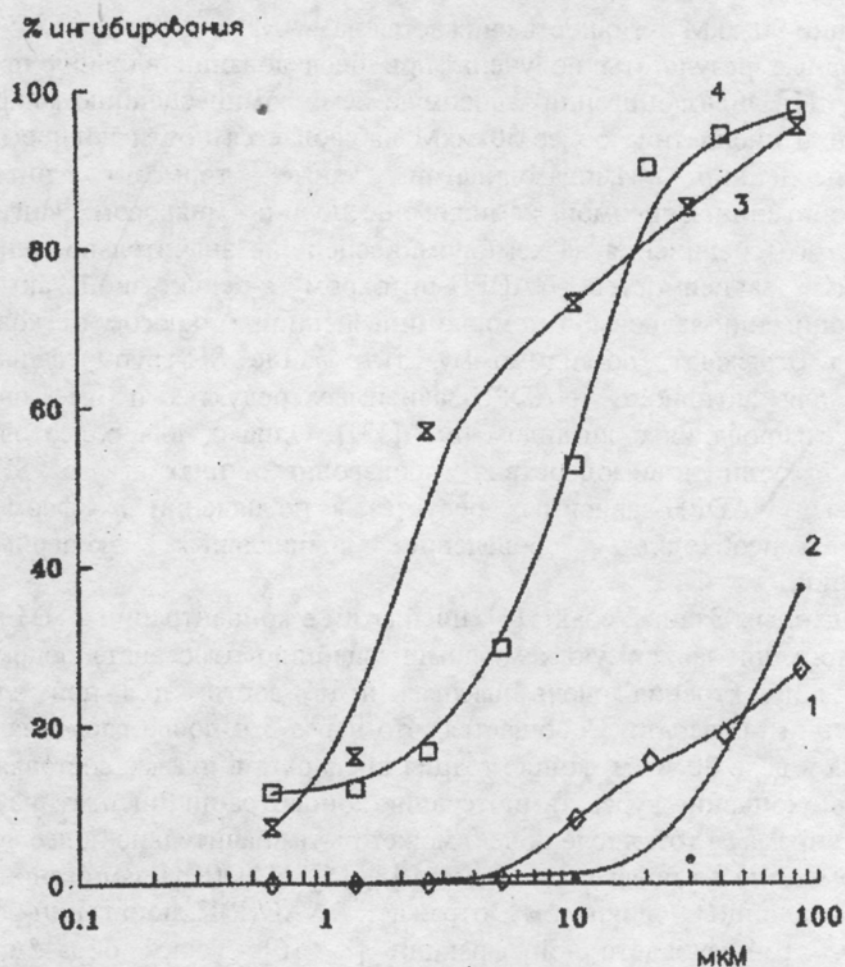


Рисунок 2.

Влияние производных платины (1 и 2 - имидазолплатин, 3 и 4 - цисплатин) на NADPH-цитохром с-редуктазную активность (2 и 3) и NADPH/люцигенин-зависимую хемилюминесценцию (1 и 4) микросом. По оси абсцисс - концентрация производных платины (на логарифмической шкале), мкМ; по оси ординат - % ингибирования скорости реакции (за первые 2 мин реакции) или хемилюминесценции (светосумма за 15 мин) по отношению к контролю (без производных платины).

Исследование влияния производных платины на ферменты, участвующие в биоактивации противоопухолевых биоредуктивных агентов (NADPH-цитохром P450-редуктаза, NADH-цитохром b_5 -редуктаза, ксантиноксидаза, ДТ-диафараза и др. [21]) может иметь значение для предсказания комбинированного действия этих препаратов на клетки-мишени. Ранее было показано, что саназол не повышает чувствительности опухолевых клеток к цисплатину, хотя увеличивает противоопухолевую активность винкристина и адриамицина [19]. Имеющиеся экспериментальные данные позволяют предположить, что отсутствие хемосенсибилизирующего действия саназола вызвано подавлением цисплатином

микросомных NADPH-зависимых редуктаз и блокированием этапа биоактивации саназола.

Таким образом, цисплатин в концентрациях, близких к терапевтическим, способен значительно снижать NADPH-цитохром *c*-редуктазную активность микросом. Поскольку цитохром *c* является одним из субстратов NADPH-цитохром P450-редуктазы [22], то результаты настоящей работы можно трактовать как влияние производных платины на первый компонент ферментативного комплекса NADPH-цитохром P450/цитохром P450. Не исключено,

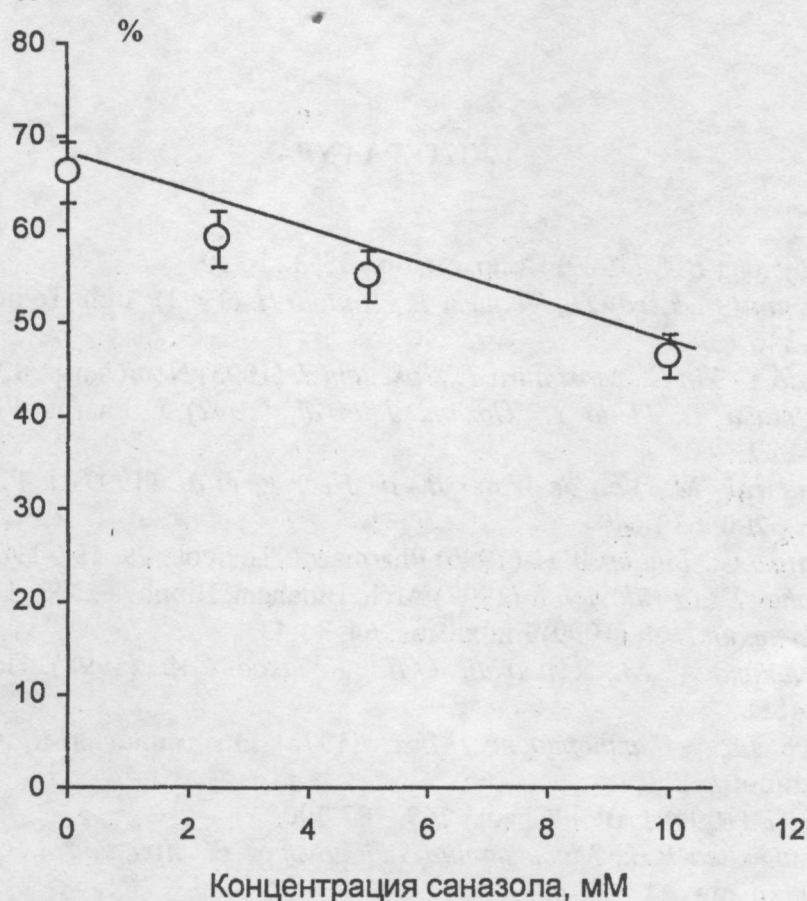


Рисунок 3.

Влияние саназола на подавление цисплатином (11 мкМ) NADPH-цитохром *c*-редуктазной активности микросом. По оси абсцисс - концентрация саназола, мМ; по оси ординат - % ингибирования цисплатином скорости реакции (за первые 2 мин) по отношению к контролю (без саназола).

что цисплатин может также подавлять диоксигеназную активность цитохрома P450 (см. [8]). Микросомные NADH-цитохром *b*₅-редуктаза и NADPH-цитохром P450-редуктаза осуществляют транспорт электронов для цитохрома P450, участвующего в метаболизме цисплатина [23]. Показано, что введение цисплатина в организм приводит к снижению уровня и активности цитохрома P450 в микросомах печени и яичек крыс [24, 25]. В связи с этим, ингибирующее влияние цисплатина на функционирование двухкомпонентной системы NADPH-цитохром P450-редуктаза/цитохром P450 может быть одним из механизмов токсического действия препарата на организм. При поиске новых менее

токсичных производных платины, *in vitro* исследование их влияния на активность NAD(P)H-оксидоредуктаз может быть одним из методов отбора перспективных препаратов. Выявленное в настоящей работе менее выраженное ингибирующее влияние имидазолплатина на микросомные NADPH-оксидоредуктазы позволяет рассматривать это производное платины как перспективное для дальнейших экспериментальных исследований в качестве противоопухолевого препарата со сниженным общетоксическим действием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горбунова В.А. (1989) *Вопр. онкол.*, **35**, 325-330.
2. Courjault F., Leroy D., Coquery L., Toutain H. (1993) *Arch. Toxicol.*, **67**, 338-346.
3. Kondo S., Yin D., Morimura T., Takeuchi J. (1995) *Neurosurg.*, **82**, 469-474.
4. Yasumasu T., Ueda T., Uozumi J. et al. (1992) *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 885-887.
5. Kruidering M., Van de Water B., de Heer E. et al. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 638-649.
6. Zhang J.G., Lindup W.E. (1996) *Pharmacol. Toxicol.*, **79**, 191-198.
7. Liochev S.I., Fridovich I. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 115-120.
8. Щепеткин И.А. (1999) *Биохимия*, **64**, 34-43.
9. Плотников В.М., Слюдкин О.П., Казаков С.А. (1998) Патент РФ, № 2114858.
10. Мосс Д.В., Баттерворт П.Дж. (1978) *Энзимология и медицина*. М., Медицина.
11. Chu G. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 787-790.
12. Шумянцева В.В., Москвитина Т.Л., Булко Т.В., Арчаков А.И. (1998) *Вопр. мед. химии*, **44**, 423-436.
13. Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Вартамян Л.С. (1979) *Биохимия*, **44**, 1401-1408.
14. Fish R.G., Shelly J., Badman M.D. et al. (1994) *Drug. Invest.*, **7**, 175-182.
15. Бровцын В.К. (1986) *Мед. радиол.*, **31**(2), 42-45.
16. Щепеткин И.А., Ахмеджанов Р.Р. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, (в печати).
17. Schuchter, L.M. (1996) *Eur. J. Cancer*, **32A** (Suppl 4), 40-42.
18. Imamura M., Edgren M.R., Murata T. et al. (1995) *Int. J. Oncol.*, **6**, 841-845.
19. Mitsuhashi N., Sakurai H., Takahashi T. et al. (1998) *Anticancer Res.*, **18**, 3463-468.
20. Shibamoto Y., Sakano K., Kimura R. et al. (1986) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **12**, 1063-1066.
21. Viode C., Bettache N., Cenas N. et al. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 549-557.
22. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Yu., Byakova O.E., Archakov, A.I. (1996) *Biochem. Molec. Biol. Intern.*, **38**, 829-838.
23. Чехун В.Ф., Пелькис Ф.П., Кулик Г.И. (1991) *Вопр. онкол.*, **37**, 954-958.

24. Bompart G. (1990) J. Toxicol. Clin. Exp., **10**, 375-383.
25. Maines M.D., Mayer R.D. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 6063-6068.

Поступила 20.04.99.

PLATINUM DERIVATIVE EFFECT ON ACTIVITY OF MICROSOMAL NADPH-OXIDOREDUCTASES

I.A. SHCHEPETKIN¹, V.M. PLOTNIKOV¹, V.T. KAGIYA²

¹Institute of Oncology, Tomsk Research Center, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, per. Kooperativnyi 5, Tomsk 634001, Russia; E-mail: oncology@info.tsu.ru

²Health Research Foundation, 14 Yoshida Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan;
E-mail: t-kagiya@ra2.so-net.or.jp

The influence of platinum derivatives, cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum) and imidazolplatin (cis-diimidazoledichloroplatinum) on the activity of rat liver microsomal NADPH-oxidoreductases was investigated *in vitro* using spectrophotometrical and chemiluminometrical methods. In the range of concentrations from 1 to 12 μM cisplatin inhibited NADPH-cytochrome *c*-reductase activity and NADPH/lucigenin-dependent chemiluminescence of microsomes. The 3 μM cisplatin decreased the NADPH-dependent reductase activity by 50%. At concentrations less than 2,5 mM sanazole (drug AK-2123) did not prevent the inhibiting influence of cisplatin on microsomal NADPH-dependent reductases. Imidazolplatin insignificantly inhibited NADPH-reductases. It is concluded that negligible inhibiting effect of imidazolplatin on microsomal NADPH-oxidoreductase allows us to consider this platinum derivative as a promising compound for further experimental trials as anticancer drug with low toxic action on the normal tissues of an organism.

Key words: cisplatin, platinum derivatives, NAD(P)H-dependent reductases, microsomes, chemiluminescence