

УДК 615.015.3:577.12:616-006.6
© Коллектив авторов

ВОЗДЕЙСТВИЕ α -ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИСТЕМУ ГЛУТАТИОНА ПЕЧЕНИ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И ПЕРЕВИТЫХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА

Л.С. Колесниченко, В.С. Лалетин, В.И. Кулинский*

Иркутский государственный медицинский университет, 664003, Иркутск,
ул. Красного Восстания, 1; факс: (83952) 24-08-26, эл. почта: greensleeves@list.ru

Исследовано влияние α -липоевой кислоты на систему глутатиона печени мышей, перевитых асцитной карциномой Эрлиха. α -Липоевая кислота вызывает разнонаправленное воздействие на систему глутатиона здоровых мышей. Асцитная карцинома Эрлиха трансформирует влияние α -липоевой кислоты, усиливая прооксидантные эффекты, более выраженные при введении в ранние сроки после перевивки опухоли. Предлагается механизм, объясняющий реализацию прооксидантных эффектов α -липоевой кислоты, в результате взаимодействия с системой глутатиона.

Ключевые слова: система глутатиона, α -липоевая кислота, асцитная карцинома Эрлиха, перекисное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время не существует единой точки зрения на проблему применения антиоксидантов в терапии и профилактике опухолей. Данные клинических исследований не позволяют решить этот вопрос – результаты их значительно варьируют в различных популяциях, порой кардинально [1].

Применение антиоксидантов потенциально может ослабить эффективность схем, основанных на развитии апоптоза опухолевых клеток путем увеличения АФК. Кроме того, некоторые антиоксиданты в определенных условиях могут оказывать прооксидантные эффекты. Тем не менее, большинство исследований *in vitro* и *in vivo* свидетельствует о том, что антиоксиданты способны замедлять развитие и прогрессирование рака [1]. В решении данной проблемы выделяют два направления: 1) определение условий и механизма проявления прооксидантных эффектов веществами, обладающими как анти-, так и прооксидантным действием;

Принятые сокращения: АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, ГПО – глутатионпероксидаза, ГР – глутатионредуктаза, ГТ – глутатионтрансфераза, ДГЛК – дигидролипоевая кислота, ЛК – α -липоевая кислота, ПОЛ – перекисное окисление липидов, TBARS – вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (thiobarbituric acid reactive substances).

* - адресат для переписки

2) влияние антиоксидантов на эффективность химиотерапии. Значение α -липоевой кислоты (ЛК) уже вышло за пределы кофермента E2 субъединицы пируватдегидрогеназы. Среди антиоксидантов ЛК занимает особое положение, благодаря сочетанию ряда свойств: (1) нейтрализация АФК и в окисленной (ЛК), и в восстановленной (дигидролипоевая кислота – ДГЛК) форме; (2) способность ДГЛК восстанавливать такие антиоксиданты как аскорбат, витамин E и убихинон; (3) модуляция липоевой кислотой сигнал-трансдукторных систем; (4) её высокая биодоступность [2, 3].

Области применения ЛК в качестве терапевтического средства постоянно расширяются [2]. Последние исследования сообщают о её противоопухолевых эффектах [3-7]. ЛК образуется в организме и присутствует в следовых количествах. Её введение создаёт высокие концентрации, не наблюдаемые в физиологических условиях, что является выраженным стрессовым воздействием для клетки в окислительно-восстановительном и метаболическом отношении. ЛК способна проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства, но механизм и условия развития последних недостаточно изучены. Появляются отдельные публикации, свидетельствующие о прооксидантном [7-13] и гепатотоксическом действии ЛК [8].

ЛК подобно глутатиону подвергается циклическим окислительно-восстановительным изменениям, в процессе которых затрачивается NADPH. Таким образом, экзогенная ЛК, конкурируя с GSH, потенциально способна нарушать функцию системы глутатиона – одной из главных антиоксидантных систем организма. Можно предположить, что прооксидантные эффекты ЛК реализуются при взаимодействии с системой глутатиона с нарушением функции последней.

Целью данного исследования было определение эффектов однократного введения ЛК на систему глутатиона печени здоровых мышей и в условиях развития опухоли.

МЕТОДИКА. Концентрацию GSH, активность главных ферментов его метаболизма – глутатионтрансферазы (ГТ), глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР) определяли в печени мышей. В ней же определяли концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS) как маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ). Исследования были проведены как на здоровых мышах, так и мышах, перевитых опухолью. В качестве модели опухолевого процесса использована асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ).

Эксперименты проведены на 83 мышах обоего пола. Мыши были разделены на 5 групп: 1 – контрольная ($n = 46$), 2 – ЛК 100 мг/кг, 3 – АКЭ, 4 – АКЭ + ЛК 100 мг/кг на 7 сутки развития опухоли, 5 – АКЭ + ЛК 100 мг/кг на 3 сутки развития опухоли ($n = 6-11$). АКЭ перевивали однократным внутрибрюшинным введением клеток опухоли. ЛК вводили однократно внутрибрюшинно.

Концентрацию GSH и активность главных ферментов его метаболизма в печени мышей измеряли стандартными спектрофотометрическими методами [14]. Концентрацию TBARS в печени мышей измеряли по методу J. Stocks et al. в модификации И.А. Волчегорского [15, 16]. Измерения во второй группе проводили через 72 ч после введения ЛК, в третьей, четвертой и пятой – на 10 сутки после перевивки АКЭ. Результаты статистически обработаны с использованием критериев F, t Стьюдента и t Велча. Описаны только статистически значимые изменения ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Введение ЛК здоровым мышам через 72 ч сопровождалось резким возрастанием активности ГР (на 287%) и намного меньше ГТ (на 37%), а также снижением активности ГПО (на 44%) (рис. 1). Выраженное увеличение активности ГР и умеренное – ГТ является благоприятной защитной реакцией и, вероятно, связано с индукцией этих ферментов. Снижение активности ГПО приводит к нарушению адекватной работы системы ГР/ГПО, снижает эффективность использования GSH и способствует накоплению АФК и развитию ПОЛ.

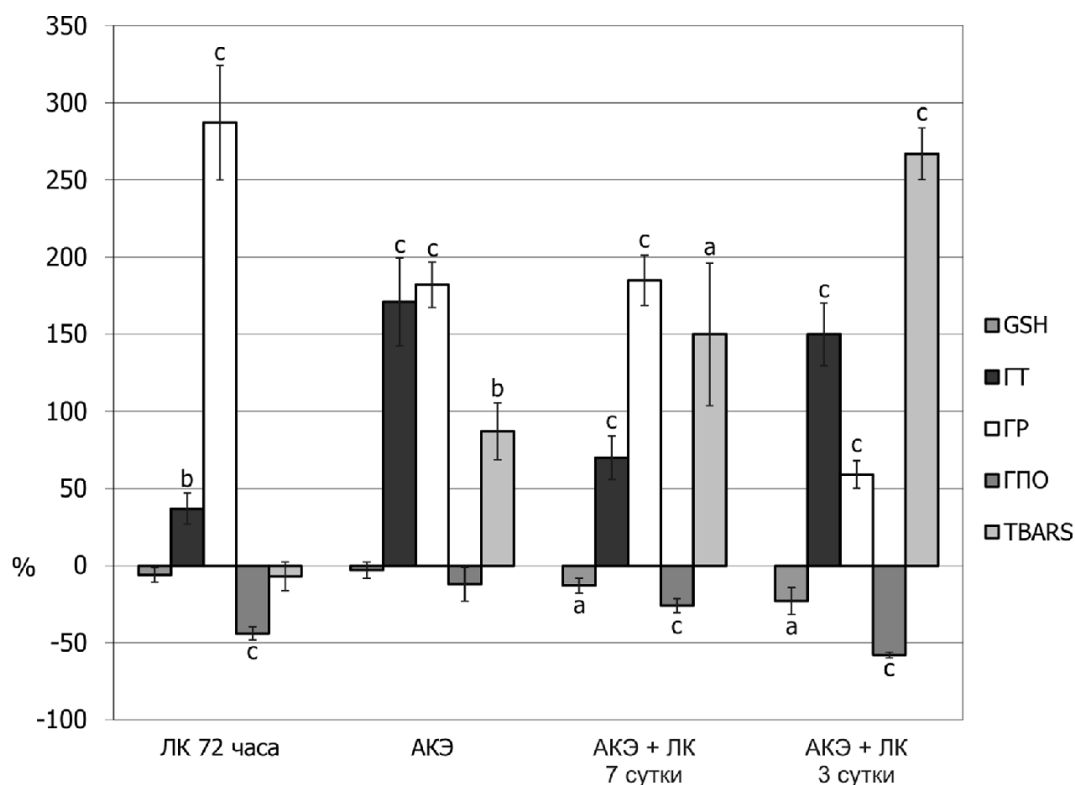


Рисунок 1.

Влияние ЛК на систему глутатиона и ПОЛ печени мышей, перевитых АКЭ.

За 0% приняты значения контрольной группы. Статистическая значимость: а - $p < 0,05$, б - $p < 0,01$, с - $p < 0,001$. ГР - глутатионредуктаза, ГПО - глутатионпероксидаза, ГТ - глутатионтрансфераза, TBARS - производные тиобарбитуровой кислоты.

На 10 сутки развития АКЭ выражено нарастала активность ГТ (на 171%) и ГР (на 182%), концентрация TBARS (на 87%). Рост активности этих ферментов – адекватная реакция на развитие оксидативного стресса.

Введение ЛК на 7 сутки после перевивки опухоли сопровождалось в сравнении с контрольной группой небольшим снижением концентрации GSH (на 13%), активности ГПО (на 26%), увеличением активности ГТ (на 70%) и ГР (на 185%), а также резким нарастанием концентрации TBARS (на 150%). В сравнении с группой мышей, перевитых АКЭ, которым ЛК не вводили, активность ГТ снижалась на 37%. Развитие опухоли трансформирует антиоксидантный эффект ЛК. В сравнении с группой здоровых мышей, которым вводили ЛК, активность ГР понижалась (на 26%).

Введение ЛК на 3 сутки развития опухоли также сопровождалось в сравнении с контрольной группой снижением концентрации GSH (на 23%), активности ГПО (на 58%), подъемом активности ГТ (на 150%) и ГР (на 59%) и резким увеличением концентрации TBARS (на 267%). В сравнении с группой мышей, перевитых АКЭ, которым ЛК не вводили, происходило снижение концентрации GSH (на 20%), активности ГР и ГПО (на 44% и 53% соответственно), а также нарастание концентрации TBARS (на 96%) (таблица). В сравнении с группой мышей, перевитых АКЭ, которым ЛК вводили на 7 сутки, возрастала активность ГТ (на 47%), снижалась активность ГР (на 44%) и ГПО (на 44%), увеличивалась концентрация TBARS (на 47%). Таким образом, введение ЛК на 3 сутки развития АКЭ сопровождается выраженными прооксидантными эффектами.

Во всех группах возрастает активность двух ферментов (ГР и ГТ), в то время как с ними резко контрастируют изменения активности ГПО.

ДЕЙСТВИЕ ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИСТЕМУ ГЛУТАТИОНА ПЕЧЕНИ

Таблица. Влияние ЛК на систему глутатиона и ПОЛ печени мышей, перевитых АКЭ.

	GSH	ГТ	ГР	ГПО	TBARS
Контроль	5,35 ± 0,11 n = 46	1012 ± 43,7 n = 42	28,2 ± 0,73 n = 42	66,7 ± 1,90 n = 42	0,054 ± 0,008 n = 15
ЛК 72 часа	5,02 ± 0,25 n = 10	1390 ± 102^b n = 7	109 ± 10,5^c n = 7	37,5 ± 2,84^c n = 7	0,050 ± 0,005 n = 9
АКЭ	5,19 ± 0,28 n = 10	2740 ± 289^c n = 10	79,4 ± 4,17^c n = 9	58,7 ± 7,37 n = 6	0,101 ± 0,010^b n = 3
АКЭ + ЛК 7 сутки	4,68 ± 0,26^a n = 11	1720 ± 143^c n = 10	80,5 ± 4,60^c n = 9	49,6 ± 3,01^c n = 9	0,135 ± 0,025^a n = 6
АКЭ + ЛК 3 сутки	4,14 ± 0,36^a n = 6	2534 ± 207^c n = 6	44,7 ± 2,52^c n = 6	27,7 ± 1,20^c n = 6	0,198 ± 0,009^c n = 6

Примечания. Концентрация GSH выражена в мкмоль/г, активность ферментов - в нмоль/мин на 1 мг белка, TBARS - в единицах экстинкции. Статистическая значимость в сравнении с контрольной группой: a - $p < 0,05$, b - $p < 0,01$, c - $p < 0,001$.

Возрастание концентрации TBARS отражает развитие оксидативного стресса в тканях печени. Можно предположить, что развитие оксидативного стресса при введении антиоксиданта ЛК в условиях развития опухоли обусловлено её окислительно-восстановительными преобразованиями (рис. 2). ЛК восстанавливается в цитоплазме клетки ферментами глутатион- и тиоредоксинредуктазами до ДГЛК с использованием NADPH. ДГЛК по градиенту концентрации выделяется во внеклеточную среду, где быстро окисляется и снова поступает в клетку, повторяя цикл. Клетка вынуждена затрачивать NADPH для поддержания окислительно-восстановительного статуса, не только внутри-, но и внеклеточной среды; данный эффект преобладает до достижения равновесной концентрации ДГЛК. Таким образом, формируется шунт, истощающий NADPH клетки [2]. Уменьшение NADPH лимитирует работу системы ГР/ГПО. Вероятно, данный механизм, реализуемый при взаимодействии экзогенной ЛК с системой глутатиона, обуславливает развитие оксидативного стресса в клетке.

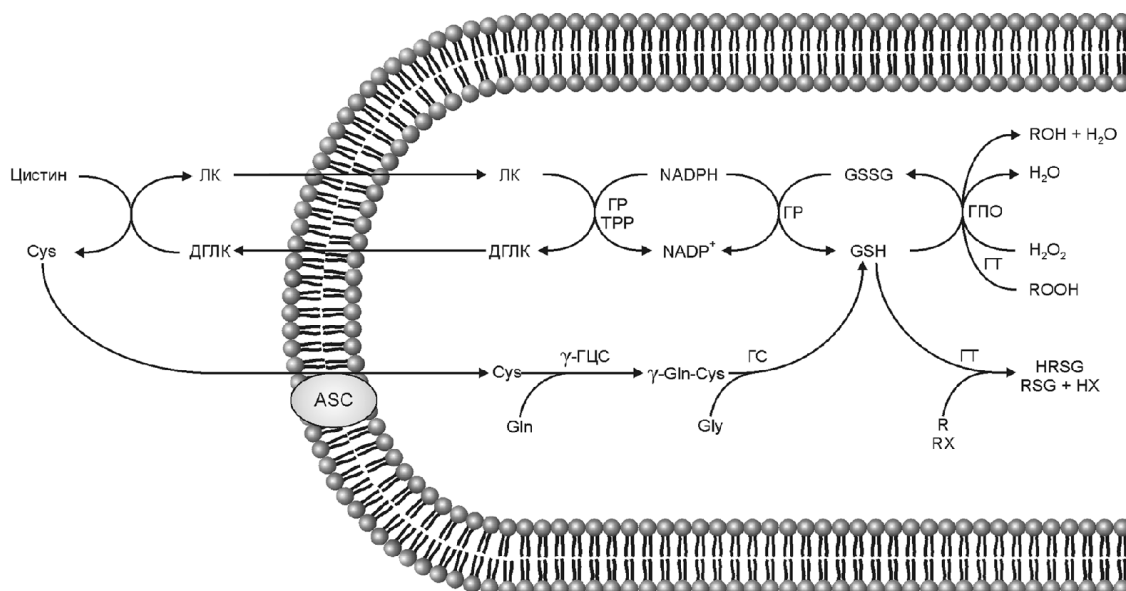


Рисунок 2.

Взаимодействие системы глутатиона с экзогенной липоевой кислотой. ГР - глутатионредуктаза, ГПО - глутатионпероксидаза, ГТ - глутатионтрансфераза, TRP - тиоредоксинредуктаза, γ-ГЦС - глутамилцистеинсинтетаза, ГС - глутатионсинтетаза, ASC - транспортер цистеина, ЛК - липоевая кислота, ДГЛК - дигидролипоевая кислота, R, RX - ксенобиотики, ROOH - органические гидроперекиси, ROH - гидроксипроизводные. Модифицирован из [2].

Изменения активности ГР значительно выражены во всех группах, тогда как в литературе обычно описывают меньшие сдвиги активности этого фермента по сравнению с ГТ и ГПО [17]. Значительный подъем активности ГР является благоприятной защитной реакцией и, вероятно, связан с его индукцией, вызванной развитием оксидативного стресса [18]. Но рост активности ГР при снижении активности ГПО малоэффективен, так как снижается элиминация АФК, нарастает ПОЛ. При возрастании активности ГР увеличивается восстановление не только GSH, но и ЛК, что увеличивает расход NADPH на восстановление внеклеточной среды. При истощении NADPH становится невозможным эффективное восстановление GSSG глутатионредуктазой (несмотря на увеличение активности ГР), что, вероятно, обуславливает снижение концентрации GSH в четвертой и пятой группах. Механизмы изменения активности ГР при введении ЛК и развитии АКЭ различны, о чем свидетельствует снижение активности ГР в группах мышей, перевитых АКЭ по сравнению с группой здоровых мышей, которым вводили ЛК.

Активность ГПО уменьшалась во всех группах мышей, которым вводили ЛК. Следует отметить, что в отличие от других ферментов активность ГПО снижалась. Наблюдаемый во всех группах подъем активности ГТ является благоприятной защитной реакцией в условиях развития оксидативного стресса.

Концентрация GSH имеет малые и непостоянные сдвиги в исследуемых группах. В литературе описано возрастание концентрации глутатиона при введении ЛК. Объясняется этот эффект следующим: во внеклеточной среде преобладают дисульфиды, в том числе цистин, транспорт которого осуществляется медленно χ_c -транспортером. При увеличении концентрации ДГЛК во внеклеточной среде происходит восстановление цистина до цистеина, который эффективнее переносится через мембрану ASC транспортером [2]. В нашем исследовании концентрация глутатиона значимо не изменялась, что, вероятно, объясняется недостаточным увеличением концентрации ДГЛК внеклеточной среды. Таким образом, полученный результат позволяет предполагать зависимое от дозы и времени влияние ЛК на концентрацию GSH клетки.

Сдвиги, полученные при введении ЛК на 3 сутки развития АКЭ, согласуются с тем, что β -окисление ЛК в культуре клеток происходит в 20 раз медленнее восстановления ЛК до ДГЛК [2]. В данном эксперименте ЛК вводили в более ранние сроки после перевивки опухоли, от момента введения препарата до проведения измерений проходил больший промежуток времени в сравнении с третьей группой мышей. Однако выраженные изменения в системе глутатиона и резкое увеличение ПОЛ позволяют предположить длительное влияние ЛК после однократного введения на систему глутатиона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Выявленные в ходе эксперимента сдвиги в системе глутатиона при однократном введении 100 мг/кг ЛК позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, ЛК проявляет как прооксидантные (умеренно снижает активность ГПО), так и антиоксидантные свойства (резкий подъем активности ГР и умеренное или высокое увеличение – ГТ). Во-вторых, развитие АКЭ модифицирует сдвиги в системе глутатиона, вызываемые ЛК, сопровождаясь умеренным снижением концентрации GSH, относительным снижением активности ГР и нарастанием концентрации TBARS. В-третьих, введение ЛК в ранние сроки после перевивки АКЭ приводит к более выраженным прооксидантным эффектам, что, вероятно, обусловлено меньшей адаптацией системы глутатиона к оксидативному стрессу, вызванному развитием опухоли и длительными циклическими окислительно-восстановительными преобразованиями ЛК.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ЛК в определенных условиях проявляет выраженные прооксидантные эффекты, которые реализуются, по меньшей мере частично, при взаимодействии с системой глутатиона с нарушением антиоксидантной функции последней.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Veeramani S., Lin M.-F.* (2008) in: Redox biochemistry (Banerjee, R., ed.), John Wiley & Sons, U.S., pp. 212–218.
2. *Han D., Hamilton R.T., Lam P.Y., Packe L.* (2008) in: Lipoic acid: energy production, antioxidant activity and health effects (Patel M.S., Packer L., eds.), CRC Press, N.-Y., pp. 293–315.
3. *Selvakumar E., Hsieh T.C.* (2008) *J. Hematol. Oncol.*, **1**, 4.
4. *Yamasaki M., Kawabe A., Nishimoto K., Madhyastha H., Sakakibara Y., Suiko M., Okamoto T., Suda T., Uehira K., Nishiyama K.* (2009) In: *Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2009 Jan 1. [Epub ahead of print].
5. *Simbula G., Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Sanna L., Deidda M., Diana A., Pibiri M.* (2007) *Apoptosis*, **12**, 113–123.
6. *Moungjaroen J., Nimmannit U., Callery P.S., Wang L., Azad N., Lipipun V., Chanvorachote P., Rojanasakul Y.* (2006) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 1062–1069.
7. *Wenzel U., Nickel A., Daniel H.* (2005) *Apoptosis*, **10**, 359–368.
8. *Perra A., Pibiri M., Sulas P., Simbula G., Ledda-Columbano G.M., Columbano A.* (2008) *Carcinogenesis*, **29**, 161–168.
9. *Cakatay U., Kayali R.* (2005) *Biogerontology*, **6**, 87–93.
10. *Cakatay U., Kayali R., Sivas A., Tekeli F.* (2005) *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **40**, 231–240.
11. *Morkunaite-Haimi S., Kruglov A.G., Teplova V.V., Stolze K., Gille L., Nohl H., Saris N.E.* (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 43–49.
12. *Kayali R., Cakatay U., Akçay T., Altuğ T.* (2006) *Cell Biochem. Funct.*, **24**, 79–85.
13. *Moini H., Packer L., Saris N.E.* (2002) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**, 84–90.
14. *Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Сотникова Г.В., Ковтун В.Ю.* (2003) *Биохимия*, **68**, 656–663.
15. *Stocks J., Gutteridge J.M., Sharp R.J., Dormandy T.L.* (1974) *Clin. Sci. Mol. Med.*, **47**, 215–222.
16. *Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э.* (2000) Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма, Издательство Челябинского государственного педагогического университета, Челябинск, с. 56–62.
17. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (2009) *Биомедицинская химия*, **55**, 255–277.
18. *Lou M.F.* (2008) in: Redox biochemistry (Banerjee R., ed.), John Wiley & Sons, U.S., pp. 74–83.

Поступила: 12. 05. 2009.

INFLUENCE OF α -LIPOIC ACID ON LIVER GLUTATHIONE SYSTEM OF HEALTHY AND EHRLICH ASCITES CARCINOMA TRANSPLANTED MICE

L.S. Kolesnichenko, V.S. Laletin, V.I. Kulinsky

Irkutsk state medical university, ul. Krasnogo Vosstaniya 1, Irkutsk, 664003 Russia;
fax: (395) 2240826; e-mail: greensleeves@list.ru

Influence of α -lipoic acid (LA) on liver glutathione system of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) transplanted mice was studied. LA causes multidirectional influence on glutathione system of healthy mice. EAC transforms LA influence, strengthening prooxidative effects more expressed at introduction in early terms after inoculation of the tumor. The mechanism explaining realization of LA prooxidative effects as a result of interaction with glutathione system is suggested.

Key words: glutathione system, α -lipoic acid, Ehrlich ascites carcinoma, lipid peroxidation.