

А. П. Бурлака<sup>2</sup>, І. І. Ганусевич<sup>2</sup>, Є. П. Сидорик<sup>2</sup>, Л. А. Мамонтова<sup>2</sup>,  
О. Б. Кучменко<sup>1</sup>, Д. М. Петухов<sup>1</sup>, Н. В. Делеменчук<sup>1</sup>, Г. В. Донченко<sup>1</sup>

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ<sup>1</sup>, КИЇВ  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО  
НАН УКРАЇНИ<sup>2</sup>, КИЇВ

## АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБЦИНУ ТА ДІЇ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРІВ БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ

Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину є активація матриксних металопротеїназ внаслідок підвищення рівня  $O_2^{\cdot-}$  та NO, що спричиняє посилення деструкції міжклітинного матриксу.

Застосування разом із доксорубіцином комплексу попередників і модуляторів убіхінону достовірно значно знижує рівні генерування супероксидних радикалів, оксиду азоту та активності матриксних металопротеїназ у тканинах, що призводить до зменшення деструкції міжклітинного матриксу і, таким чином, суттєво нівелює токсичну дію доксорубіцину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: убіхінон, матриксні металопротеїнази, супероксидний аніон-радикал, оксид азоту.

ВСТУП. Доксорубіцин є антибіотиком антрациклінового ряду, який досить широко використовують як антинеопластичний агент. Проте його дозозалежний протипухлинний ефект прямо корелює з дозозалежним проявом токсичності відносно печінки, серця та інших органів [3, 14]. Однією з причин пошкоджувального впливу доксорубіцину є активування процесів вільнорадикального окиснення і розвиток окисного стресу [10, 19].

Регуляція сталості й деградації міжклітинного матриксу необхідна для нормального перебігу багатьох фізіологічних процесів. Розвиток низки патологічних процесів, зокрема серцево-судинних, онкологічних, аутоімунних захворювань тощо, пов'язаний з порушенням регуляції деградації міжклітинного матриксу. Важливу роль у цьому процесі, крім інших ферментів, відіграють ферменти родини матриксних металопротеїназ (ММП), які здатні руйнувати білки міжклітинного матриксу та базальних мембран: колагени, протеоглікани, еластин, ламінін, фібронектин та ін. [2, 12, 21, 22, 24, 25]. Порушення регуляції активності ММП та їх надмірну активацію розглядають на сьогодні як один із ранніх механізмів ініціації та розвитку серцевої недостатності [22].

© А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, Є. П. Сидорик, Л. А. Мамонтова, О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов, Н. В. Делеменчук, Г. В. Донченко, 2011.

ММП належать до родини Zn-залежних ендопептидаз. За первинною структурою, субстратною специфічністю та клітинною локалізацією ці ферменти можна поділити на чотири основні підгрупи: колагенази, желатинази, стромелізини та мембранозв'язані ММП [26].

ММП-2 і ММП-9, які ми вивчали, належать до підродини желатиназ. Ці ферменти можуть руйнувати колагени типів IV, V, еластин у складі базальних мембран та денатурований колаген (желатин), чим вони доповнюють функції колагеназ у процесах деградації фібрилярних колагенів [26].

Убіхінон (CoQ) відіграє центральну роль у мітохондріальних біоенергетичних процесах, є важливим жиророзчинним антиоксидантом. Проблема забезпечення організму людини та тварин CoQ за рахунок його ендогенного синтезу завжди є актуальною у зв'язку з тим, що це досить складний багата стадійний процес, який залежить від багатьох причин, включає дуже тонкі механізми його регуляції, що часто порушуються як у здоровому організмі (за умов недостатнього, нераціонального харчування, нестачі вітамінів, екологічних порушень), так і при різноманітних захворюваннях, що супроводжуються порушенням енергетичного обміну загалом та гальмуванням біосинтезу CoQ зокрема [4, 11, 20].

Сьогодні препарати CoQ набули широко застосування при дерматологічних проблемах, зокрема в косметології, причому одним з вагомих факторів протекторного впливу CoQ визнано зменшення експресії та активності ММП [9, 18]. Також є досвід застосування препаратів CoQ при серцево-судинних, онкологічних та інших захворюваннях [13, 16]. В патогенезі цих захворювань важливу роль відіграє стан міжклітинного матриксу. Так, ефект CoQ на ММП на сьогодні продемонстровано в дослідженнях на пухлинних клітинах MCF-7, де спостерігали зменшення активності ММП-2 [15].

Тому метою даної роботи було дослідити активність ММП-2 і ММП-9 та швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів і оксиду азоту в тканинах печінки, серця, нирок і мозку щурів за умов введення доксорубіцину та дії комплексу попередників і модуляторів біосинтезу CoQ.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** В досліді використовували щурів-самців масою 180–220 г. Тварин було поділено на 3 групи: 1-ша – контрольні (інтактні) тварини; 2-га – тварини, яким вводили доксорубіцин (Д); 3-тя – тварини, яким на фоні введення доксорубіцину вводили  $\alpha$ -токоферилацетат, ПОБК і М (комплекс ЕПМ) [7].

Доксорубіцин (Доксорубіцин-КМП, доксорубіцину гідрохлорид, ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна) вводили внутрішньочеревно в дозі 2,2 мг/кг маси тіла щоденно протягом 8 днів [8, 23]. Контрольна група щурів отримувала фізіологічний розчин у такому ж об’ємі. Біологічно активні сполуки тварини одержували перорально протягом 8 днів паралельно із введенням доксорубіцину.

Щурів декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Ступінь генерування супероксидних аніон-радикалів та оксиду азоту оцінювали методом ЕПР на комп’ютеризованому спектрометрі PE-1307. Для визначення рівнів генерування NO NO-синтазами використовували спіновий уловлювач – діетилдитіокарбамат, а реєстрацію проводили при температурі рідкого азоту (77 K). Швидкість генерування супероксидних радикалів визначали із застосуванням спінового уловлювача – 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксил за умов кімнатної температури [1].

Концентрації активних форм ММП-2 і ММП-9 оцінювали методом зимографії в 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом на-

трію та 0,1 % желатином як субстратом [17]. Електрофорез проводили при 4 °С, 150 V протягом 4 год. Після розділення білків гель відмивали в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з CaCl<sub>2</sub> (pH 7,5) протягом 18 год при 37 °С, фіксували і фарбували 0,25 % Кумасі діамантовим синім та візуалізували, як описано [17]. Протеолітичну активність оцінювали шляхом вимірювання розмірів зони лізису, використовуючи тест-системи для ММП-2 і ММП-9 (Sigma, USA). Результати оброблено з використанням стандартної програми “TotalLab1.01”.

Результати роботи оброблено за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані наведено у формі середньої величини з стандартною помилкою ( $M \pm m$ ). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента (t).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати проведених досліджень показали, що за введення тваринам доксорубіцину спостерігалось зростання швидкості генерування супероксидних радикалів у тканинах печінки, серця, нирок і мозку (рис. 1). Разом із цим, у тканинах вказаних органів відзначали достовірне підвищення рівня оксиду азоту порівняно з контрольними тваринами (рис. 2).

За умов застосування комплексу попередників та медіаторів біосинтезу убіхінону ЕПМ спостерігалось достовірне зниження швидкості генерування супероксидних радикалів в тканинах печінки, серця, нирок та мозку тварин, які отримували доксорубіцин (рис. 1). Такі ж зміни відбувались і з вмістом оксиду азоту – вони наближались до величин цього показника у контрольних тварин (рис. 2).

Показано, що за введення доксорубіцину достовірно зростала активність ММП-2 і ММП-9 у всіх досліджених тканинах порівняно з кон-

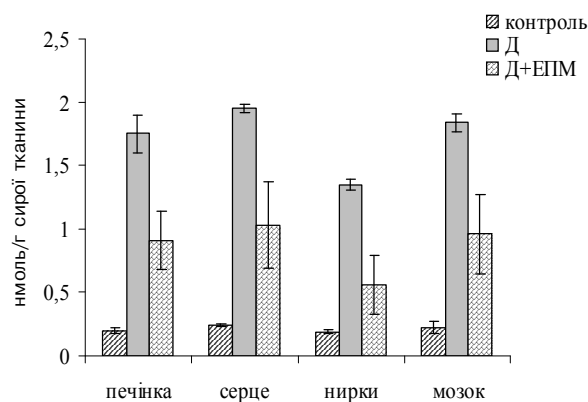


Рис. 1. Рівні швидкості генерування супероксидних радикалів в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

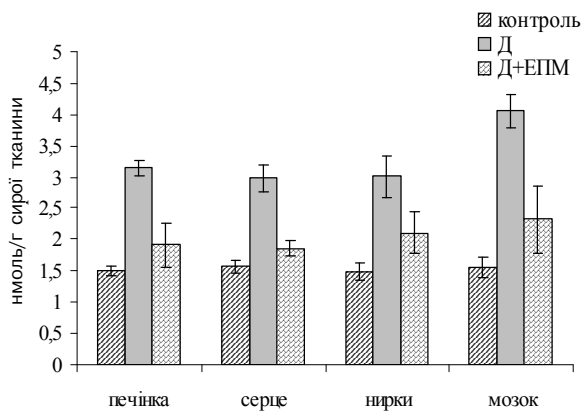


Рис. 2. Рівень оксиду азоту в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

трольними величинами (рис. 3, 4 відповідно). Особливо високі показники активності ферментів спостерігались у тканинах нирок.

Отримані нами результати свідчать про те, що високі рівні активних форм кисню та азоту, які утворюються за умов введення доксорубіцину, можуть регулювати активність ММП-2 і ММП-9 за спільним механізмом.

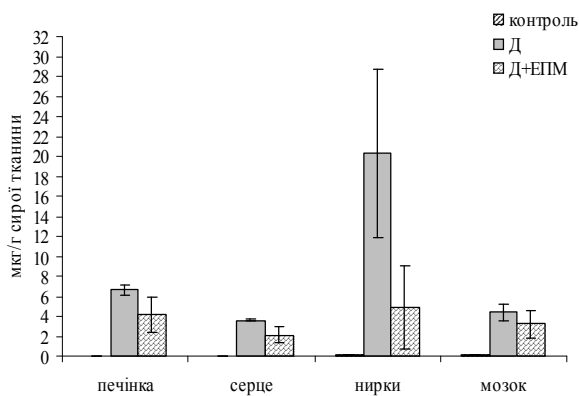


Рис. 3. Активність матричної металопротеїнази-2 (ММП-2) (концентрація активної форми ферменту) в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

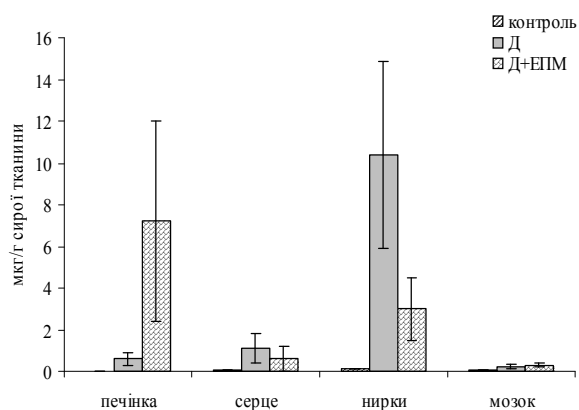


Рис. 4. Активність матричної металопротеїнази-9 (ММП-9) (концентрація активної форми ферменту) в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Відомо, що активність ММП регулюється супероксидними радикалами та  $NO^{\cdot}$  на транскрипційному та посттрансляційному рівнях, тобто на рівнях експресії та активації [6].

Зокрема, латентні форми ММП-2 і ММП-9 містять продомени із консервативною послідовністю в активному центрі, до складу якої входять залишок цистеїну та  $Zn^{2+}$ . Активується профермент внаслідок дисоціації  $Zn^{2+}$ -цистеїн-з'язку за рахунок взаємодії із супероксидними радикалами та/або активними формами оксиду азоту, які є тіолмодифікуючими агентами [5].

За введення щурам разом із доксорубіцином комплексу ЕПМ спостерігалось зниження активності ММП-2 порівняно з тваринами, яким вводили доксорубіцин, у всіх досліджуваних органах, хоча ці величини залишались дещо вищими за значення у контролі. Найбільш виразні зміни (в 3,5 раза) відбувались у тканинах нирок (рис. 3).

Активність ММП-9 також зменшувалась за введення доксорубіцину разом із комплексом ЕПМ порівняно з тваринами, які отримували тільки доксорубіцин (рис. 4). Як і при визначенні активності ММП-2, за введення доксорубіцину найбільш виразні зміни (в 3 рази) активності ММП-9 спостерігались у тканинах нирок (рис. 4). Винятком є тканини печінки, де, навпаки, показник зростає.

Відомо, що ММП-9 вважають судинспецифічним ферментом, вона відіграє ключову роль в ангиогенезі. Зростання її активності в тканинах печінки майже в 10 разів за введення доксорубіцину з комплексом ЕПМ, порівняно з введенням лише доксорубіцину, свідчить про запуск процесів утворення нових судин, що може бути реакцією пристосування до хронічної дії токсичного агента.

Отже, за введення щурам доксорубіцину в усіх досліджених тканинах спостерігалась значна активація ММП-2 і ММП-9, що, як відомо, супроводжувалось пошкодженням міжклітинного матриксу та порушенням перебігу різних фізіологічних процесів. За умов застосування доксорубіцину з комплексом попередників і модуляторів біосинтезу убихінону ЕПМ спостерігалось зменшення активності ММП-2 і ММП-9, що свідчить про зменшення ступеня деструкції міжклітинного матриксу та нормалізацію фізіологічних процесів.

**ВИСНОВКИ.** 1. Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину є активація ММП, яка зумовлена підвищенням рівня  $O_2^{\cdot-}$  і  $NO$ , що спричиняє посилення деструкції міжклітинного матриксу.

2. За умов застосування разом із доксорубцином комплексу попередників і модулаторів убихінону відбувається значне зниження рівня генерування супероксидних радикалів,

оксида азоту та активності ММП у тканинах, що призводить до зменшення деструкції міжклітинного матриксу і, таким чином, суттєво нівелює токсичну дію доксорубцину.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака А. П. Кінетичні закономірності швидкості генерування і вмісту радикалів кисню в мембранах ендоплазматичного ретикулуму при хімічному канцерогенезі печінки і молочних залоз / А. П. Бурлака, М. Й. Данко, Є. П. Сидорик // Доповіді НАН України. – 1994. – № 10. – С. 141–145.
2. Бурлака А. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик. – К. : Наукова думка, 2006. – 228 с.
3. Ватугин М. Т. Антрациклиновая кардиомиопатия / М. Т. Ватугин, Н. В. Калинин, Е. В. Кетинг. – Донецк : ДонДІШ, 2001. – 236 с.
4. Донченко Г. В. Биохимия убихинона / Г. В. Донченко. – К. : Наукова думка, 1988. – 240 с.
5. Ефекти радикальних форм кисню і оксиду азоту: формування клітинної гіпоксії та активація матриксних металопротеїназ / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик, І. І. Ганусевич, С. П. Осинський // Експериментальна онкологія. – 2006. – № 1. – С. 49–53.
6. Мітохондріальний редокс-контроль матриксних металопротеїназ та метастазування у хворих на рак молочної залози / А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, Є. В. Лук'янчук, Є. П. Сидорик // Онкологія. – 2010. – **12**, № 4 (46). – С. 377–382.
7. Пат 82639, Україна, А61К31/355. Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Донченко Г. В., Кузьменко І. В., Кучменко О. Б., Петухов Д. М. – заявл. 26.09.06 ; опубл. 25.04.08, Бюл. № 8.
8. Сократительная функция и энергетический метаболизм сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии / В. И. Капелько, А. Н. Хаткевич, С. Н. Дворянцев [и др.] // Кардиология. – 1997. – № 2. – С. 31–35.
9. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids / B. Fullek, D. Smith, A. Howerton, D. Kern // J. Cosmetic Dermatology. – 2006. – 5, № 1. – P. 30–38.
10. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity / J. L. Quiles, J. R. Huertas, M. Battino [et al.] // Toxicology. – 2002. – **180**. – № 1. – P. 79–95.
11. Bentiger M. The antioxidant role of coenzyme Q / M. Bentiger K. Brismar, G. Dallner // Mitochondrion. – 2007. – Suppl: P. 41–50.
12. Change in matrix metalloproteinases activities in normal and transformed mouse fibroblasts under of antioxidants / I. V. Voronkina, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, I. A. Gamalii // Tsitologija. – 2008. – **50**. – P. 877–881.
13. Coenzyme q10: is there a clinical role and a case for measurement? / S. L. Molyneux, J. M. Young, C. M. Florkowski [et al.] // Clin. Biochem. – 2008. – **29**, № 2. – P. 71–82.
14. Conklin K. A. Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity / K. A. Conklin // Integrative Cancer Therapies. – 2005. – **4** (2). – P. 110–130.
15. Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model / M. Bahar, S. Khaghani, P. Pasalar [et al.] // Nutrition J. – 2010. – **9**. – P. 62–69.
16. Hertz N. Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q10 and other antioxidants: a pilot study / N. Hertz, R. E. Lister // J. Intern. Med. Res. – 2009. – **37**, № 6. – P. 1961–1971.
17. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / Y. A. De Clerck, N. Perez, H. Shimada [et al.] // Cancer Res. – 1992. – **52**. – P. 701–708.
18. Inni M. Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo / M. Inni, M. Ooe, K. Fujii // Biofactors. – 2009. – **35**, № 5. – P. 435–441.
19. Li T. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol / T. Li, P. K. Singal // Circulation. – 2000. – **102**, № 17. – P. 2105–2110.
20. Littarru G.-P. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update / G.-P. Littarru, L. Tiano // Nutrition. – 2010. – **26**. – P. 250–254.
21. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment / K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, R. Bicknell // Cell. – 2010. – **141**. – P. 52–67.
22. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase / P. Spallarossa, P. Altieri, S. Garibaldi [et al.] // Cardiovascular Research. – 2006. – **69**. – P. 736–745.
23. Muhammed H. Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation / H. Muhammed, C.K.R. Kupur // Biochem. J. – 1984. – **214**. – P. 493–498.
24. Nelson K. K. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases / K. K. Nelson, J. A. Melendez // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – **37**. – P. 768–784.
25. Serum level of matrix metalloproteinases-1, -2, -3 and -9 in thoracic aortic diseases and acute myocardial ischemia / G. T. Karapanagiotidis, P. Antonitsis, N. Charokopos [et al.] // J. Cardiothoracic Surgery. – 2009. – **4**. – P. 59–64.
26. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // Circulation Res. – 2003. – **92**, № 8. – P. 827–839.

А. П. Бурлака<sup>2</sup>, И. И. Ганусевич<sup>2</sup>, Е. П. Сидорик<sup>2</sup>, Л. А. Мамонтова<sup>2</sup>,  
Е. Б. Кучменко<sup>1</sup>, Д. Н. Петухов<sup>1</sup>, Н. В. Делеменчук<sup>1</sup>, Г. В. Донченко<sup>1</sup>  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ<sup>1</sup>, КИЕВ  
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ  
ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ<sup>2</sup>, КИЕВ

## АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ДОКСОРУБИЦИНА И ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА УБИХИНОНА

### Резюме

Важной составляющей токсического эффекта доксорубицина является активация матриксных металлопротеиназ, обусловленная повышением уровня  $O_2^-$  и NO, что является причиной усиления деструкции межклеточного матрикса.

Применение совместно с доксорубицином комплекса предшественников и модуляторов убихинона достоверно значительно снижает уровни генерирования супероксидных радикалов, оксида азота и активности матриксных металлопротеиназ в тканях и, таким образом, существенно нивелирует токсическое действие доксорубицина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, матриксные металлопротеиназы, супероксидный радикал, оксид азота.

A. P. Burlaka<sup>2</sup>, I. I. Hanusevych<sup>2</sup>, Ye. P. Sydoryk<sup>2</sup>, L. A. Mamontova<sup>2</sup>,  
O. B. Kuchmenko<sup>1</sup>, D. M. Petukhov<sup>1</sup>, N. V. Delemenchuk<sup>1</sup>, H. V. Donchenko<sup>1</sup>  
O. V. PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE<sup>1</sup>, KYIV  
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY  
OF NAS OF UKRAINE<sup>2</sup>, KYIV

## MATRIX METALLOPROTEINASES' ACTIVITY IN TISSUES OF RATS UNDER DOXORUBICIN EFFECT AND TREATMENT WITH COMPLEX OF PRECURSORS AND MODULATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS

### Summary

The important part of doxorubicin toxicity is an activation of MMPs, caused by increase of  $O_2^-$  and NO-level, which leads to increased destruction of extracellular matrix.

The treatment by complex of precursors of modulators of ubiquinone biosynthesis in parallel to doxorubicin leads to significant decrease in tissue MMPs activities, which leads to decrease in destruction of extracellular matrix and thus to notable reduction of doxorubicin toxicity.

KEY WORDS: ubiquinone, matrix metalloproteinases, superoxide anion radical, nitric oxide.

Отримано 13.05.11

Адреса для листування: О. Б. Кучменко, аб. скр. 148, Київ, 02100, Україна.