

ТИОЛ-ДИСУЛЬФНЫЙ СТАТУС КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА

Звериснский И.В., Зверинская Н.Г., Сутько И.П., Янкевич Н.В., Телегин П.Г., Титко О.В.

ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси» 230030, г. Гродно, БЛК-50, zverinsky@tut.by

Редокс-зависимые процессы в значительной степени влияют на функциональную активность многих белков принимающих участие в таких важных клеточных событиях как пролиферация, дифференцировка, апоптоз. В последние годы исследователей в области разработки новых противоопухолевых препаратов привлекло внимание клеточная тиол-дисульфидная регуляция. Особый интерес представляют результаты, указывающие на возможность модуляции пролиферирующей активности как нормальных, так и опухолевых клеток, путем искусственного изменения внутриклеточного редокс состояния [Montera A.J., Jassem J. 2011].

Среди белков ответственных за поддержание редокс-потенциала клетки особое место занимают две тиолдисульфидные редуктазы – тиоредоксин и глутаредоксин, которые входят в состав суперсемейства тиоредоксинов. Эти ферменты полифункциональны и образуют тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые системы, играющие критическую роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза. Первая система содержит помимо тиоредоксина, NADPH-зависимую тиоредоксинредуктазу. В клетках млекопитающих имеются две тиоредоксиновые системы – цитозольная (TRX 1) и митохондриальная (TRX 2). Основная функция белков этого класса – восстановление дисульфидных групп в белках. В свою очередь тиоредоксины восстанавливаются NADPH-зависимой реакцией, тиоредоксинредуктазой. В отличие от глутатиона, внутриклеточная концентрация тиоредоксина низкая. В тоже время его восстанавливающая активность по отношению к транскрипционным факторам примерно в 1000 раз выше, чем у глутатиона и это в свою очередь и объясняет, почему тиоредоксин намного специфичен как восстановитель для редокс регулируемых сигнальных каскадов [Biaglow J.E., Miller R.A. 2005].

Тиоредоксины обладают многими функциями: выполняют роль ростового фактора, осуществляет регуляцию активности ряда транскрипционных факторов (ядерный фактор kB, активатор протеинов-1, p53, глюкокортикоидные рецепторы), способствуют фолдингу белков, служат кофактором ряда ферментов, таких, например, как пероксиредоксины, рибонуклеотидредуктаза и метионинсульфоксидредуктаза, участвуют в репарации ДНК. Особо следует отметить, что большинство опухолевых клеток животных и человека отличаются повышенным уровнем тиоредоксина [Sun Y., Rigas B. 2008].

Вторая система включает в себя восстановленный глутатион, в качестве агента восстанавливающего окисленный глутаредоксин и глутатионредуктазу. Субстратами глутаредоксина являются дисульфиды и смешанные дисульфиды. В отличие от глутаредоксина для тиоредоксина характерна крайне низкая активность или полное ее отсутствие по отношению к смешанным дисульфидам. S-глутатионирование белков является важным регуляторным механизмом биохимических процессов благодаря обратимой модификации белков. Ряд белков претерпевает обратимое S-глутатионирование при изменении внутриклеточного редокс-статуса. К таким белкам относятся, например, шапероны, белки цитоскелета и регуляторы клеточного цикла. Глутаредоксин является основным ферментом, катализирующим как образование, так и восстановление смешанных дисульфидов [Sies H. 1999].

Глутаредоксин, как и тиоредоксин играют важную роль в процессах формирования лекарственной резистентности опухолевых клеток. Следует заметить, что эти две ферментные системы функционально взаимосвязаны и дополняют друг друга, в регулировании редокс-баланса клетки.

Предполагается, что тиоредоксин и глутаредоксин являются атипичными факторами роста, так как они не связываются с каким-либо специфическим рецептором. По всей видимости, их можно рассматривать не как факторы роста, а как важные ростовые факторы. Вероятно механизмы, лежащие в основе ростовой активности, могут реализовываться на уровне предотвращения инактивации или повышении активности других эндогенных факторов.

Поиск средств, способных регулировать активность этих белков является одним из приоритетных направлений при создании и "конструировании" противоопухолевых препаратов.

Лекарственные препараты из природного сырья занимают весомое место на фармацевтическом рынке. В современном арсенале лекарственных средств, препараты растительного происхождения составляют 30-40%. К основным классам вторичных метаболитов растений проявляющих высокое биологическое действия относятся: алкалоиды, флавоноиды и изопреноиды.

В качестве модулятора активности тиоредокс-зависимых систем мы исследовали эффект кверцетина [Casella M.L. et al. 2013].

Опыты проведены на крысах самцах породы Wistar начальной массой 120-150 г. Кверцетин вводили внутривентриально, ежедневно в течение 14 суток в дозе 10 мг/кг. Кверцетин растворяли вначале в небольшом количестве ДМСО из расчета 1.0 мг кверцетина на 15 мкл ДМСО, а затем прибавляли 985 мкл 0.2 М натрий фосфатного буфера рН 7,6. Содержание ДМСО в растворе для инъекции составляет 1,5%. Контрольным животным вводится 0.2 М натрий фосфатный буфер рН 7.6 с 1.5% содержанием ДМСО в дозе 10 мл/кг. На 15 сутки животных декапитировали, делали забор крови, печень перфузировали и методом дифференциального центрифугирования выделяли ядерную, митохондриальную и постмитохондриальную фракции, в которых определяли содержание SH-групп, активность тиоредоксинредуктазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, липоамиддегидрогеназы, дигидроаскорбатредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы. Белок определяли по методу Лоури. В цельной крови и ткани печени определяли содержание GSH. Достоверность полученных результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Проведенные исследования показали, что назначение кверцетина в дозе 10 мг/кг/день в течение 14 суток сопровождается ростом каталитической активности в сыворотке крови глутатионредуктазы на 23% ($p < 0.05$). Содержание SH-групп, активность глутатион- и тиоредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы были на уровне контрольной группы.

При введении кверцетина наибольший редокс-модулирующий эффект был зарегистрирован в ядерной и митохондриальной фракции печени крыс.

В частности в ядерной фракции назначение кверцетина приводило к падению каталитической активности глутатионредуктазы на 20% и снижению содержания пула SH-групп на 55% ($p < 0.05$).

Ингибирующий потенциал кверцетина на тиол-дисульфидный обмен в наибольшей степени проявился в отношении тиоредоксинредуктазы. Так активность этого фермента в постмитохондриальной фракции снижается на 38%, в то время как в митохондриях на 92.5%.

К другим редокс-модулирующим эффектам кверцетина следует отнести увеличение пула SH-групп на 42% и рост активности глутатионредуктазы в митохондриальной фракции на 18%, а также увеличение содержания GSH в печени на 21% ($p < 0.05$).

Остальные исследуемые показатели были на уровне контрольной группы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что кверцетин обладает редокс модулирующим потенциалом. Предполагается, что данный эффект реализуется через избирательное ингибирование тиоредоксинредуктазы.

Исследования проведены в рамках задания 3.11. «Поиск эффективных ингибиторов природного происхождения тио- и глутаредоксиновых систем, как мишеней противораковой терапии» ГПНИ «Медицина и фармация»

Литература

1. Montera A.J., Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer // *Drugs* – 2011. Vol.71, N11. P. 1385-1396.
2. Biaglow J.E., Miller R.A. The thioredoxin reductase/thioredoxin system. Novel targets for cancer therapy // *Cancer Biology and Therapy* – 2005. - Vol.4, N1. - P.6-13.
3. Sun Y., Rigas B. The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for mechanism of action of anticancer agents // *Cancer Res.* – 2008. Vol.68, N20, P.8269-8277
4. Sies H. Glutathione and its cellular functions // *Free Radic. Biol.Med.* - 1999, Vol. 27. P. 916–921.
5. Casella M.L., Parody J.P., Ceballos M.P. et al. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2013. Vol.1. P.361-372.