

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 616.24-006.6:547.497.1.

ВПЛИВ СЕМІКАРБАЗИДУ НА ПЕРОКСИДАЦІЮ ТА РОЗВИТОК КАРЦИНОМИ ЛЬЮЇС У МИШЕЙ

Л. М. ПЕТРУНЬ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: petrun@biochem.kiev.ua

Досліджували вплив семікарбазиду на метастазування карциноми Льюїс та процеси пероксидації в мишей лінії C57B1. Встановлено, що доза семікарбазиду 1/120 LD₅₀ у тварин із прищепленою карциномою Льюїс гальмує ріст пухлини та зменшує метастазування в легенях (P < 0,05). За впливу семікарбазиду в цій дозі в організмі мишей значно гальмуються процеси утворення вільних радикалів та активних форм кисню на тлі зменшення рівня альдегідів, що пов'язано з їхньою властивістю реагувати із семікарбазидом.

Ключові слова: семікарбазид, карцинома Льюїс, процеси пероксидації, альдегіди, пухлина.

Відомо, що в процесі тривалого введення молодим тваринам семікарбазид виявляє виражену латирогенну дію, яка призводить до значних структурних порушень сполучної і кісткової тканин завдяки тому, що інгібує лізілоксидазну реакцію, зв'язуючись з її проміжними продуктами семіальдегідної природи [1, 2].

Нами підтверджено [3], що внаслідок застосування семікарбазиду протягом 40 діб в організмі щурів посилюються процеси утворення активних форм кисню, нітритів та нітратів на тлі зменшення рівня альдегідів, що пов'язано з акцепторними властивостями семікарбазиду, а також із гальмуванням синтезу формальдегіду та прискоренням його перетворення на форміат [3]. Це пояснюється тим, що семікарбазид взаємодіє з усіма альдегідами, в тому числі і малоновим діальдегідом як синергетиком. Тобто семікарбазид є сильним антиоксидантом, який блокує вільні радикали і захищає клітини від ушкодження, порушень, зумовлених оксидативним стресом, та від формальдегіду – речовини, яка може спричинити мутації [4, 5]. З іншого боку, препарат ефективно пригнічує активність ензиму SSAO (semicarbazide-sensitive amine oxidase). Надмірно висока активність цього ензиму призводить до утворення в організмі високотоксичних альдегідів і низки інших сполук,

які пошкоджують здорові клітини та їхній генетичний апарат. Експериментальне інгібування SSAO спричинює зниження приросту маси тіла, зменшує рівень всмоктування їжі [6]. Тобто значне інгібування SSAO може мати не лікувальну, а, навпаки, шкідливу для організму дію [7].

Особливу увагу привертає до себе антиоксидантна активність семікарбазиду, оскільки в ракових клітинах природно утворюється багато більше вільних радикалів, ніж у нормальних тканинах, відбувається біохімічна перебудова – ДНК змінюється і втрачає стабільність. Це сприяє росту пухлини, підвищується її стійкість до цитостатиків. Дані відносно участі лізілоксидози [8, 9] та SSAO в метастазуванні пухлин [10, 11] навели нас на думку про можливе використання семікарбазиду як протипухлинного препарату в точно визначеній дозі.

Метою роботи було перевірити як впливають різні дози семікарбазиду на перебіг процесів пероксидації в організмі мишей без карциноми і з карциномою, а також на ріст пухлини та поширення метастазування.

Матеріали і методи

Експерименти було проведено на мишах-самках лінії C 57B1/6 з масою тіла 20–22 г. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та корму.

Усі дослідження здійснювали згідно з нормами, встановленими законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та норм, прийнятих Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей.

Як експериментальну модель пухлинного росту використовували штам метастазуючої карциноми легенів Льюїс (3LL). Суспензію пухлинних клітин ($1,0 \cdot 10^6$) прищеплювали мишам у стегно правої задньої кінцівки.

Щоб визначити максимально переносиму дозу семікарбазиду в мишей, першу серію досліджень проводили на інтактних тваринах. У другій серії мишам дослідних груп, починаючи із 7-ї доби (після пальпаторного визначення початку росту пухлини) протягом 10 діб перорально вводили семікарбазид у дозі 0,9; 0,45 та 0,225 мг/мишу, що відповідає $1/5 LD_{50}$, $1/10 LD_{50}$ та $1/20 LD_{50}$ відповідно. Контрольним тваринам (IV група) вводили такий самий об'єм дистильованої води.

Заміри росту пухлини проводили тричі протягом досліджу з інтервалом 6 діб. Мишей забивали на 22-гу добу за розвинутого метастатичного процесу. Об'єм та кількість метастазів у легенях мишей визначали за загально прийнятим методом. У тканині печінки визначали рівень пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ, за накопиченням малонового діальдегіду) [12], активність ксантиноксидази (КОД) [13], глутатіонпероксидази (ГП) [14] та вміст сечової кислоти [15]. Показники кислотно-лужного стану крові: рН, pO_2 , pCO_2 , загальне CO_2 , HCO_3^- та зсув буферних основ встановлювали на аналізаторі газів крові OP-215 (Radelkis, Угорщина). Стати-

стичну обробку одержаних результатів проводили з використанням критерію Стюдента.

Результати і обговорення

Внаслідок перевірки кислотно-лужного стану (КЛС) крові мишей першої серії досліджень виявили, що в тварин всіх дослідних груп розвивається поглиблений метаболічний ацидоз, а саме: рН зменшується до 6,73–6,82 порівняно з контролем (7,25), а зсув буферних основ зменшується до (-40,6 мекв/л) – (-31,8 мекв/л) порівняно з контролем (-11,7 мекв/л). Оскільки ацидоз завжди зумовлює в організмі порушення процесів пероксидації, нами було досліджено активність ензимів антиоксидантного захисту.

В умовах введення семікарбазиду (табл. 1) активність прооксидантного ензиму ксантиноксидази в тканині печінки мишей збільшується від 17,1 до 80% пропорційно збільшенню дози семікарбазиду. Це призводить до посилення катаболізму пуринів, що підтверджується зростанням рівня сечової кислоти – кінцевого продукту пуринового обміну – на 11,6–40%. Активність антиоксидантного ензиму глутатіонпероксидази, навпаки, зменшується на 14,5–36,2%. Тобто ацидоз, що спостерігається в організмі мишей, значне підвищення активності прооксидантного та зменшення активності антиоксидантного ензимів свідчать про посилення розвитку оксидативного стресу. Найменші порушення в цих дослідженнях спричинював семікарбазид у дозі $1/20 LD_{50}$.

Наявні ознаки оксидативного стресу за інтоксикації семікарбазидом не призводять до зростання показника ПОЛ. Він не тільки не збільшується, як це відбувається

Таблиця 1. Вплив семікарбазиду на показники пероксидації в печінці мишей ($M \pm m$, $n = 8$)

Показники	Контроль	Дози семікарбазиду		
		$1/20 LD_{50}$	$1/10 LD_{50}$	$1/5 LD_{50}$
Ксантиноксидаза, нмоль сеч. к-ти/хв·мг протеїну	$7,35 \pm 0,3$	$8,62 \pm 0,4^*$	$10,2 \pm 0,08^*$	$13,24 \pm 0,3^*$
Глутатіонпероксидаза, мкмоль глутат. окисл./хв·мг протеїну	$0,23 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,02^*$	$0,15 \pm 0,02^*$
Сечова кислота, мкг/г сир. тканини	$69,0 \pm 4,0$	$77,0 \pm 3,0$	$85,0 \pm 7,0^*$	$98,0 \pm 7,0^*$
ПОЛ, нмоль малон. діальдегід/мг сир. тканини	$21,76 \pm 1,00$	$20,75 \pm 0,75$	$18,3 \pm 1,1^*$	$17,1 \pm 1,5^*$

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

за багатьох патологічних станів, а навпаки – зменшується на 4,7–18% відносно такого в контрольних тварин. Активність ПОЛ визначалася нами за інтенсивністю накопичення малонового діальдегіду, а семікарбазид зв'язує всі альдегіди, в тому числі і малоновий, з утворенням відповідних семікарбазонів. Відомо, що підвищена продукція альдегідів в умовах оксидативного стресу призводить до зменшення в клітинах концентрації глутатіону. Цистеїн, що бере участь в його синтезі, зв'язується альдегідами з утворенням тіазолідинів [16].

Нами показано, що семікарбазид у дозі $1/20 LD_{50}$ за введення мишам із карциномою Льюїс (рис. 1) посилює ріст пухлини на 21,6–23,6% порівняно з контрольною групою. Досліджено дію семікарбазиду в менших дозах – $1/80 LD_{50}$ та $1/120 LD_{50}$. Доза семікарбазиду $1/120 LD_{50}$ спричинює вірогідне зменшення росту пухлини (рис. 2). Вивчення кислотно-лужного стану крові свідчать про суттєві зміни фізіологічного стану тварин, особливо у разі застосування дози $1/120 LD_{50}$ (табл. 2). Незважаючи на незначне підвищення рН крові порівняно з мишами, які не отримували семікарбазид, рівень бікарбонату підвищується на 49%, а зсув буферних основ (найбільш наочний із показників КЛС) зменшується на 34%. Вважаємо, що це позитивний прояв нормалізації обміну речовин. Підтвердженням цього є зменшення ксантиноксидазної активності (одного з основних каталізаторів утворення супероксидного радикала) на 31,5% в печінці мишей, що отримували семікарбазид в дозі $1/120 LD_{50}$ порівняно з мишами, що не отримували препарат (табл. 3).

Зазначені відносно малі дози семікарбазиду значно зменшують (табл. 4) метастатичне ураження легенів. Особливо це помітно за використання семікарбазиду в дозі $1/120 LD_{50}$: вірогідно зменшується як кількість метастазів, так і їх об'єм. Семікарбазид в цій дозі значно пригнічує ріст пухлини після 10 введення препарату.

Таким чином, одержані дані вказують на користь того, що в умовах введення семікарбазиду в малих дозах в організмі мишей лінії C57B1 зменшуються процеси пероксидації, що пригнічує як ріст пухлин, так і зменшує

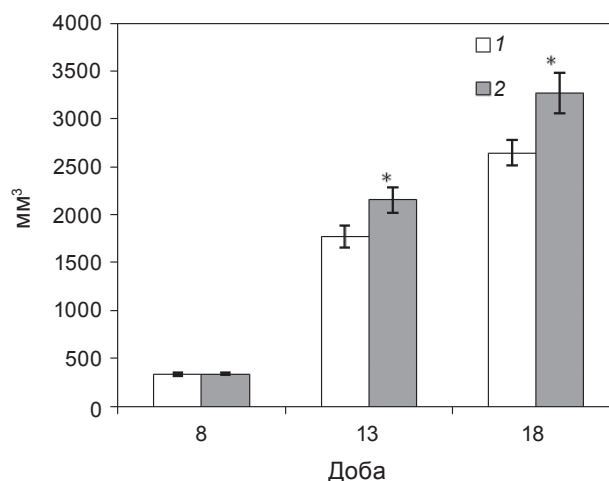


Рис. 1. Вплив семікарбазиду на ріст пухлини в мишей з карциномою Льюїс: 1 – пухлина; 2 – пухлина + семікарбазид $1/20 LD_{50}$. Тут і на рис. 2 * $P < 0,05$ порівняно з пухлиною

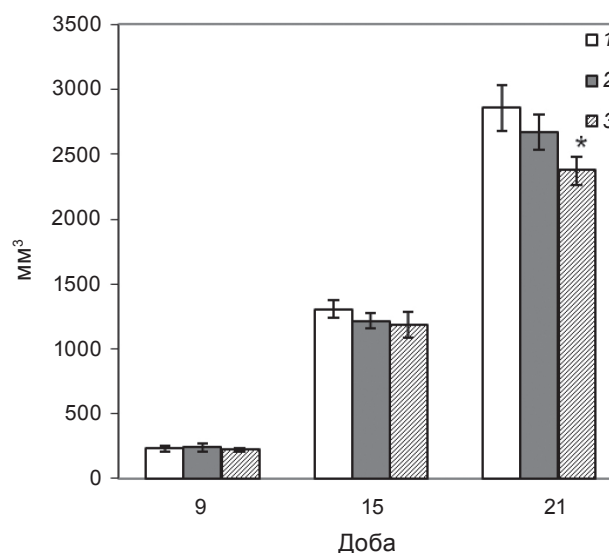


Рис. 2. Вплив семікарбазиду на ріст пухлини в мишей з карциномою Льюїс: 1 – пухлина; 2 – пухлина + семікарбазид $1/80 LD_{50}$; 3 – пухлина + семікарбазид $1/120 LD_{50}$

метастазування. Дійшли висновку, що в умовах введення мишам лінії C57B1 малих доз семікарбазиду за розвитку експериментальної карциноми Льюїс можна досягти протипухлинного ефекту, оскільки семікарбазид у цих умовах виявляє антиоксидантну дію.

Таблиця 2. Зміна кислотно-лужного стану в організмі мишей за введення малих доз семікарбазиду ($M \pm m$, $n = 8$)

Показники	Групи			
	Контроль	Пухлина	Пухлина + 1/80 LD ₅₀	Пухлина + 1/120 LD ₅₀
pH	7,15 ± 0,04	7,13 ± 0,03	7,10 ± 0,1	7,15 ± 0,07
pO ₂ , мм рт.ст.	80,7 ± 7,9	72,75 ± 10,30	79,42 ± 11,10	73,2 ± 10,8
pCO ₂ , мм рт.ст.	40,1 ± 3,2	32,37 ± 2,80	26,0 ± 5,9	36,9 ± 2,9
CO ₂ tot, мМ/л	17,8 ± 1,5	14,15 ± 4,30	13,3 ± 1,2	16,65 ± 4,40
HCO ₃ , мМ/л	16,6 ± 1,2	9,25 ± 1,20	9,56 ± 1,10	13,8 ± 1,3*
Зсув буф. основ мекв/л	-14,1 ± 1,4	-19,7 ± 2,6	-18,5 ± 2,9	-13,0 ± 2,2*

Тут і в табл. 3 * $P < 0,05$ порівняно з пухлиною

Таблиця 3. Зміна ксантиноксидазної активності за впливу семікарбазиду в малих дозах у тканині печінки мишей з карциномою Льюїс, нмоль сечової к-ти/хв·мг протеїну ($M \pm m$, $n = 8$)

Показники	Контроль	Пухлина	Пухлина + 1/80 LD ₅₀	Пухлина + 1/120 LD ₅₀
Абсолютні значення	10,8 ± 0,3	14,3 ± 0,09	13,9 ± 0,3	9,8 ± 0,2*
Відсоток відносно пухлини	–	100	97,2	68,5
Відсоток відносно контролю	100	+ 32	+ 29	- 9

Таблиця 4. Вплив семікарбазиду в різних дозах на метастазування в легенях мишей ($M \pm m$, $n = 7$)

Група	Кількість метастазів	% змін	Об'єм метастазів, мм ³	% змін
Контроль	7,5 ± 1,0		6,89 ± 1,86	
1/80 LD ₅₀	9,75 ± 0,58 *	+26,6	3,51 ± 1,51*	-49
1/120 LD ₅₀	5,25 ± 1,27 *	-30	1,77 ± 0,33 *	-74,3

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

ВЛИЯНИЕ СЕМИКАРБАЗИДА НА ПЕРОКСИДАЦИЮ И РАЗВИТИЕ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС У МЫШЕЙ

Л. М. Петрунь

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: petrun@biochem.kiev.ua

Исследовали влияние семікарбазидна на метастазирование карциномы Льюис и процессы пероксидации у мышей линии С57В1. Установлено, что доза семікарбазидна 1/120 LD₅₀ у жи-

вотных с привитой карциномой Льюис тормозит рост опухоли и снижает метастазирование в легких ($P < 0,05$). Под влиянием семікарбазидна в этой дозе в организме мышей значительно тормозятся процессы образования свободных радикалов и активных форм кислорода на фоне уменьшения уровня альдегидов, что связано с их способностью реагировать с семікарбазидом.

Ключевые слова: семікарбазид, карцинома Льюис, процессы пероксидации, альдегиды, опухоль.

INFLUENCE OF SEMICARBAZIDE ON THE PEROXIDATION PROCESSES AND LEWIS CARCINOMA GROWTH IN MICE

L. M. Petrun

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: petrun@biochem.kiev.ua

Effects of various doses of semicarbazide on Lewis carcinoma metastasing and peroxidation processes in C57Bl mice have been investigated. In the animals with inoculated Lewis carcinoma, the semicarbazide in the dose of 1/120 LD₅₀ had practical influence on the tumour growth and inhibited the metastasing into mice lungs ($P < 0.05$). Importantly, this dose significantly inhibited the formation of free radicals and active forms of oxygen against the background of decrease of the aldehydes level that was related to the acceptor properties of the drug.

Key words: semicarbazide, Lewis carcinoma, peroxidation processes, aldehydes, tumour.

References

1. Maki J. M., Sormunen R., Lippo S., Kaarteenaho-Wiik R., Soininen R., Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues // *Am. J. Pathol.* – 2005. – **167**, Iss. 4. – P. 927–936.
2. Maranghi F., Tassinari R., Marcoccia D., Altieri I., Catone T., De Angelis G., Testai E., Mastrangelo S., Evandri M. G., Bolle P., Lorenzetti S. The food contaminant semicarbazide acts as an endocrine disrupter: Evidence from an integrated *in vivo/in vitro* approach // *Chem. Biol. Interact.* – 2010. – **183**, Iss. 1. – P. 40–48.
3. Dmytrenko M. P., Shandrenko S. G., Petrun L. M., Kishko T. O., Silonova N. V., Latishko N. V., Gudkova O. O., Sushkova V. V. Formaldehyde metabolism under semicarbazide intoxication // *Ukr. Biochem. J.* – 2010. – **82**, N 4. – P. 86–91. (In Ukrainian).
4. Grimstrud P. A., Xie H., Griffin T. J., Bernlohl D. A. Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**, N 32. – P. 21837–21841.
5. Morgan K. T. A brief review of formaldehyde carcinogenes in relation to rat nasal pathology and human risk assessment // *Toxicol. Pathol.* – 1997. – **25**. – P. 291–307.
6. Sherif H. M. F. In search of a new therapeutic target for the treatment of genetically triggered thoracic aortic aneurysms and cardiovascular conditions: insights from human and animal lathyrism // *Interact. CardioVasc. Thorac. Surg.* – 2010. – **11**. – P. 271–276.
7. Kinemuchi H., Sugimoto H., Obata T., Satoh N., Ueda S. Selective inhibitors of membrane-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in mammalian tissues // *Neurotoxicology.* – 2004. – **25**(2). – P. 325–335.
8. Erler J. T., Bennewith K. L., Nicolau M., Dornhöfer N., Kong C., Le Q. T., Chi J. T., Jeffrey S. S., Giaccia A. J. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis // *Nature.* – 2006. – **440**(7088). – P. 1222–1226.
9. Erler J. T., Bennewith K. L., Cox T. R., Lang G., Bird D., Koong A., Le Q.-T., Giaccia A. J. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche // *Cancer Cell.* – 2009. – **15**(1). – P. 35–44.
10. Postovit L. M., Abbott D. E., Payne S. L., Wheaton W. W., Margaryan N. V., Sullivan R., Jansen M. K., Csiszar K., Hendrix M. J., Kirschmann D. A. Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration // *J. Cell Biochem.* – 2008. – **103**. – P. 1369–1378.
11. Garpenstrand H., Bergqvist M., Brattström D., Larsson A., Orelund L., Hesselius P., Wagenius G. Serum semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity correlates with VEGF in non-small-cell lung cancer patients // *Med. Oncol.* – 2004. – **21**, N 3. – P. 241–250.
12. Chirkin A. A. *Practicum in Biochemistry.* – Minsk: Novoye znaniye, 2002. – 512 p. (In Russian).
13. Kozachenko A. M., Rashba Yu. E., Vartanyan L. S. New inhibitors of xanthine oxydase from the class of pyrazole(3,4-d-pyrimidines) and pyrazole(3,4-pyridines-pyrimidones): action mechanism of allopyrinol, its analogs // *Khim. Pharmacol. Zhurn.* – 1982. – N 6. – P. 10–15. (In Russian).

14. *Moin V. M.* A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes // *Lab. Delo.* – 1986. – N 12. – P. 724–728. (In Russian).
15. *Pushkina N. N.* *Biochemical Methods of Research.* – Moscow: Medgiz, 1983. – 395 p. (In Russian).
16. *Kallen R. G.* The mechanism of reactions involving Schiffbase intermediates. Thiazolidine formation from L-cysteine and formaldehyde // *J. Am. Chem. Soc.* – 1971. – **93**(23). – P. 6236–6248.

Отримано 30.11.2012