

**УДК 577.15:616.1-092.4:615.276**

## **ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЩУРІВ З АНТРАЦИКЛІНОВОЮ КАРДІОПАТІЄЮ**

*Гордієнко Ю.А., Кулініч А.А., Шаульська О.Е., Шевцова А.І.*

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія», Дніпропетровськ, Україна  
E-mail: gordienko.ju@gmail.com*

Проведено дослідження активності трипсиноподібних ферментів (ТПА), матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 у щурів з доксорубіцин-індукованою кардіопатією і оцінено вплив корвітину на їх активність. Експериментально доведено підвищення активності означених ферментів в крові при застосуванні доксорубіцину. Під дією корвітину ТПА не відновлювалась, а активність ММП2 та ММП9 знижувалась, причому активність ММП9 була нижчою за норму. У серцевому м'язі ТПА зменшувалась, а при застосуванні корвітину відновлювалась практично до нормальних значень. Зроблено висновок про незалежне функціонування трипсиноподібних ферментів та желатинази А і В за умов антрациклінової кардіопатії. Отримані дані дозволяють припустити, що одним з механізмів кардіотерапевтичного ефекту корвітину є зниження активності желатинази В.

**Ключові слова:** антрациклінові антибіотики, доксорубіцин, желатинази А і В, трипсиноподібні ферменти.

### **ВСТУП**

Застосування антрациклінових антибіотиків (АА) для лікування онкозахворювань обмежується їх високою токсичністю. Кардіопатія, що виникає на фоні прийому цих препаратів, зазвичай, є незворотним процесом і характеризується низкою метаболічних порушень у міокарді, супроводжуючись змінами активності кардіоспецифічних ферментів та білків у крові. Відомі на сьогодні біохімічні маркери кардіологічної патології не завжди відбивають ступінь ураження кардіоміоцитів, перебіг захворювання та ефективність лікування, тому зусилля дослідників спрямовані на пошук нових, значно чутливіших маркерів означеної патології. Останнім часом все більшу увагу привертають матриксні металопротеїнази (ММП) – ферменти, що гідролізують білки міжклітинного матриксу і регулюють обмін білків в клітинному оточенні. Підвищення активності ММП призводить до надмірної деструкції основних біополімерів екстрацелюлярного матриксу, дестабілізації та порушення структурної цілісності серцевого м'язу [1] і розвитку кардіопатії. Сімейство ММП містить біля 30 ферментів серед яких найбільш «популярними» в кардіології є желатинази А і В (ММП2 та ММП9, відповідно). Встановлено, що активність желатиназ у плазмі крові змінюється при різних формах серцево-судинних захворювань, проте, наведені у літературі дані досить суперечливі. За даними одних авторів рівень желатиназ підвищується при гострому коронарному синдромі і корелює зі ступенем

ураження міокарду [2], у той час як інші дослідники не знаходять суттєвих відмінностей у активності желатиназ при серцево-судинних захворюваннях [3].

Пошук препаратів, які б нівелювали або значно зменшували небажаний кардіотоксичний вплив АА, оптимізуючи метаболізм кардіоміоцитів, та дозволили б зберегти нормальну скорочувальну здатність міокарду, є актуальною задачею. Перспективним препаратом в цьому відношенні вважають корвітин – водорозчинний комплекс біофлавоноїду кверцетину з полівінілпіролідом. Відомо, що цей препарат проявляє антиоксидантну дію, знижує ступінь активації ПОЛ та прояви дисфункції лівого шлуночку за умов антрациклінової терапії [4]. Однією з властивостей кверцетину є його спроможність виступати у якості скавенджера АФК, гальмуючи прозапальні процеси [5], що також призводить до зменшення ушкоджуючої дії АА. Незважаючи на чисельну кількість досліджень, вплив цього препарату на процеси протеолізу у кардіоміоцитах та екстрацелюлярному матриксі не визначено.

Метою нашої роботи було оцінити активність трипсиноподібних ферментів, матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 в плазмі крові та гомогенаті серцевого м'язу щурів за умов доксорубіцин-індукованої кардіопатії і визначити вплив корвітину на активність означених ферментів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експеримент проводили на самцях щурів лінії Wistar вагою  $210 \pm 50$  г. Тварин розділили на 3 групи по 8 щурів. У групах, крім контрольної, була застосована модель КП [6], для чого шурам щотижня впродовж чотирьох тижнів вводили доксорубіцин (Доксорубіцин-КМП, доксорубіцину гідрохлорид, ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) у дозі 1 мг/кг. Другу групу склали тварини з індукованою КП, 3 – щури, що за 30-60 хвилин перед введенням доксорубіцину (ДР) отримували корвітин (Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна) внутрішньочеревно в дозі 5 мг/кг. Інтактні щури замість ДР отримували ін'єкції фізіологічного розчину. На п'ятому тижні експерименту тварин було декапітовано з використанням тіопенталу натрію (60 мкг/кг) згідно принципів Хельсинської декларації щодо гуманного поводження з дослідними тваринами.

Активність серцево-специфічних ферментів у плазмі крові піддослідних щурів визначали за допомогою тест-наборів Elitech diagnostics (Seppim S.A.S., Франція) на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі ВА-88 Mindray (Китай). Для оцінки активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) і МВ форми креатинкінази (КК-МВ) застосовували відповідні кінетичні методи, ЛДГ – метод на основі оптичного тесту Варбурга з L-лактатом у якості субстрату. Для дослідження кількості білку використовували біуретовий метод. Всі аналізи проведено згідно інструкцій до наборів реактивів та аплікаційних програм щодо їх застосування на аналізаторі ВА-88.

Активність желатиназ в плазмі щурів оцінювали методом прямої ензим-зимографії з попереднім вертикальним електрофорезом зразків плазми у 10 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та додаванням 1 % желатини як субстрату [7]. Дія цих ферментів проявлялась як прозорі зони лізису на синьому фоні, причому ступінь знебарвлення цих зон була пропорційна активності

ферменту. Відповідність зон проММП9, ММП9, проММП2 і ММП2 визначали за допомогою маркерів Bio-Rad Lab (Німеччина) та позитивного контролю на ці ферменти Sigma (США). Отримані зимограми сканували і далі проводили кількісну оцінку активності желатиназ за допомогою комп'ютерної програми Sorbfil 2.0, розраховуючи відсоток активності цих ферментів у експериментальних тварин відносно стандартного зразка, в якому активність кожної желатинази була прийнята за 100 %. Цей стандарт готували шляхом змішування однакових об'ємів (по 50 мкл) зразків плазми інтактних щурів контрольної групи. Отриманий стандарт розливали по аліквотах, заморожували і зберігали впродовж 6 місяців при температурі -32 °С. Кожного разу при проведенні ензим-зимографії аліквоту розморожували і вносили 10 мкл стандарту в одну з лунок поліакриламідного гелю, в інші лунки вносили по 10 мкл зразків плазми експериментальних тварин.

Гомогенат тканин отримували шляхом розтирання їх зі скляним піском у холодному 0,025 М трис-НСl буфері з рН 7,2 у співвідношенні 1:4 та подальшим центрифугуванням впродовж 5 хвилин при 8000 об/хв. Отриманий супернатант відбирали для подальших досліджень.

Концентрацію трипсиноподібних ензимів досліджували використовуючи синтетичний безбарвний субстрат бензоїларгінін-р-нітроанілід з утворенням забарвленого в жовтий колір п-нітроаніліну, кількість якого визначали на мікропланшетному рідері Human при довжині хвилі 410 нм.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента та U-критерій Уїлкоксона (Манна-Уїтні). Вірогідними вважали результати при  $p \leq 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Антибіотики антрациклінового ряду, що широко використовуються в терапії злоякісних новоутворень призводять до чисельних ускладнень. Найбільш загрозливим для життя пацієнтів є розвиток кардіопатії, що характеризується порушенням контрактильної властивості серцевого м'язу, збільшенням післянавантаження на міокард, зростанням розміру лівого шлуночка [8]. Одним з основних чинників зазначених ускладнень є активація перекисного окислення ліпідів і утворення активних форм кисню (АФК), що негативно впливають на структуру мембран кардіоміоцитів. Доведена руйнівна роль АА стосовно внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів. Висока спорідненість АА до кардіоліпіну – основного фосfolіпиду внутрішньої мембрани мітохондрій – призводить до утворення комплексу АА-кардіоліпін, що здатен руйнувати мембрану мітохондрій кардіоміоцитів [9]. Підвищена проникність мембранної системи та інтенсифікація енергетичного обміну призводять до збільшення у крові активності стандартних серцево-специфічних біохімічних маркерів – АсАТ, ЛДГ, КК-МВ, що частково підтверджено і нашими даними. Як видно з рис. 1 при КП активність АсАТ та ЛДГ вірогідно збільшується. МВ-форма креатинкінази являється гострофазовим ферментом і підвищується у перші години ушкодження міокарду. Після другої доби активність КК-МВ зазвичай повертається до норми [10]. У нашому випадку активність цього ензиму знаходиться приблизно у тих же

межах, що і в групі інтактних тварин, що свідчить про перехід захворювання до кінця експерименту у хронічну стадію.

Для запобігання токсичному впливу АА використовують різноманітні кардіопротективні засоби, але більшість з них має свої обмеження у застосуванні. Проте привертає на себе увагу біофлавоноїд кверцетин, який практично не має побічної дії. Кардіопротективна дія цього препарату проявляється у нейтралізації АФК та поступовому блокуванні вільнорадикальної ліпопероксидації мембран. У нашому дослідженні ми використали комплексний препарат на основі кверцетину – корвітин. Під впливом цього препарату активність усіх вищезначених ферментів ( $p \leq 0,05$ ) вірогідно знижувалась. Зниження активності АсАТ та КК-МВ досягалося, швидше за все, мембраностабілізуючою дією корвітину. Зниження активності ЛДГ обумовлено здатністю препаратів кверцетину пригнічувати процеси гліколізу [11].

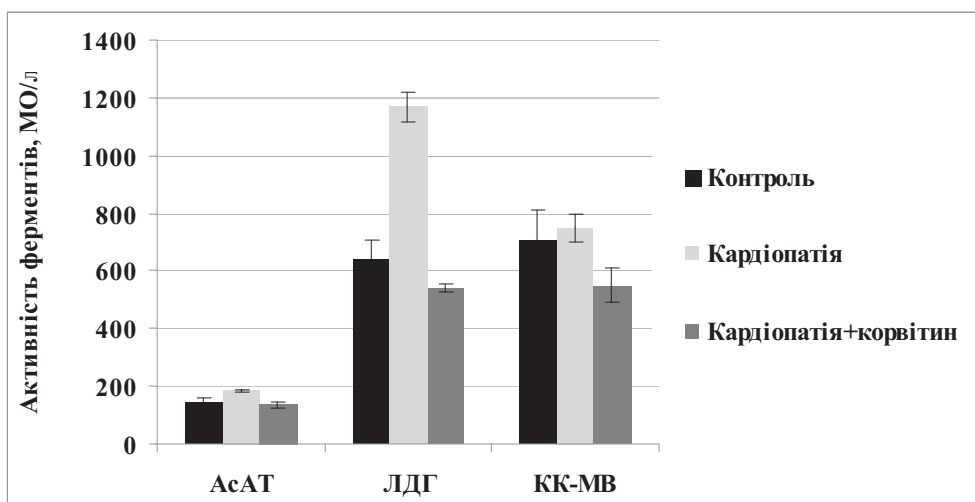


Рис. 1. Активність серцево-специфічних ферментів при доксорубіцин-індукованій кардіопатії у щурів.

Цікаві результати отримані при дослідженні активності трипсиноподібних (ТПА) ферментів у крові та серцевому м'язі експериментальних тварин (табл. 1). У плазмі крові рівень ТПА за умов КП збільшувався у 3 рази порівняно з нормою і не відновлювався при використанні корвітину. Концентрація загального білку плазми крові, навпаки, знижувалась у групі з КП і була найнижчою у щурів, що отримували корвітин одночасно із ДР. Найбільш високе співвідношення трипсин/білок спостерігалось у групі з ДР-індукованою КП. Враховуючи, що джерелом ТПА в крові, крім панкреатичних протеаз, є тромбін, калікреїн, тромбокіназа та плазмін, можна припустити, що введення корвітину призводить до активації систем коагуляції та фібринолізу. Застосування корвітину практично не впливало на співвідношення ТПА/білок, отже, корвітин не впливає на активність означених вище протеолітичних ферментів.

Іншим джерелом ТПА в крові може бути вихід внутрішньоклітинних ферментів у кровоносне русло, тому ми провели оцінку ТПА у гомогенаті серцевого м'язу. Як видно з наведених у табл.1 даних, рівень ТПА за умов КП знижувався у 2 рази, а при використанні корвітину відновлювався практично до нормального рівня. Концентрація загального білку в серцевому м'язі була вірогідно вищою у другій та третій групах, ніж у інтактних тварин, причому, найбільших значень вона досягала у 3 групі, що отримувала корвітин разом з доксорубіцином. На відміну від плазми крові, в серцевому м'язі спостерігається тенденція до відновлення співвідношення ТПА/білок під дією корвітину. Парадоксальна ситуація – зменшення ТПА в серцевому м'язі на тлі збільшення цього показника в крові – може мати тільки одне пояснення: під дією ДР частина внутрішньоклітинних трипсиноподібних ферментів поступає у кровоносне русло за рахунок ушкодження клітинних мембран. Застосування корвітину призводить до зменшення мембраноушкоджуючої дії ДР.

**Таблиця 1**

**Активність трипсиноподібних (ТПА) ферментів у плазмі крові та серцевому м'язі експериментальних груп щурів**

Група тварин	Плазма крові			Гомогенат серцевого м'язу		
	Білок мг/мл	ТПА МО/мл	ТПА/білок МО/мг	Білок мг/мл	ТПА МО/мл	ТПА/білок МО/мг
I група (контроль)	59,90±1,28	0,083±0,016	1,4×10 <sup>-3</sup>	7,43±0,91	1,39±0,12	0,192
II група (кардіопатія)	55,43±2,04	0,246±0,036*	4,6×10 <sup>-3</sup>	8,72±0,87	0,67±0,04**	0,081**
III група (кардіопатія+ корвітин)	48,30±2,32	0,237±0,050*	4,2×10 <sup>-3</sup>	10,02±0,30 <sup>§</sup>	1,13±0,06 <sup>§</sup>	0,112 <sup>§</sup>

*Примітка:* \* – вірогідна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи при p≤0,05, \*\* – при p≤0,01; <sup>§</sup> – вірогідно по відношенню до групи з КП p≤0,05.

Для оцінки впливу ДР на деградацію білків в екстрацелюлярному матриксі використовували визначення матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9, або желатиназ. За фізіологічних умов желатинази синтезуються кардіоміоцитами у незначній кількості. При КП відбувається ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, що супроводжується виразними змінами активності желатиназ (табл. 2). Посилення активності означених ензимів можна пояснити генеруванням значної кількості АФК при застосуванні АА. У свою чергу, АФК посилюють активність ядерного фактору транскрипції NF-κB та експресію прозапальних цитокінів, а саме ІЛ-6, які у різному ступені підвищують активність обох желатиназ [12].

**Таблиця 2**  
**Відносна активність желатиназ (%) при доксорубіцин-індукованій кардіопатії у експериментальних щурів**

Група щурів	проММП9	ММП9	проММП2	ММП2
I група (контроль)	104,00±8,18	98,33±4,53	98,00±2,94	97,33±1,19
II група (кардіопатія)	182,67±29,78 <sup>§</sup>	117,42±4,37	113,36±4,27	116,71±3,20
III група (кардіопатія + корвітин)	128,43±16,19*	76,88±3,66*	117,60±11,69	107,50±6,37

*Примітка:* <sup>§</sup>  $p \leq 0,05$  – вірогідна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи, \*  $p \leq 0,05$  – вірогідно по відношенню до групи з КП.

Відомо, що існує пряма кореляція між експресією желатиназ та стадією захворювання: сплеск експресії желатинази В супроводжує початковий етап захворювання, натомість експресія желатинази А посилюється при переході захворювання у хронічну стадію [13]. За умов нашого експерименту виявлене вірогідне підвищення активності прожелатинази В, що говорить про більш інтенсивну експресію цього ферменту при формуванні КП. Що стосується желатинази А, то підвищення активності цього ензиму при КП не було вірогідним. У період між 4 і 6 тижнями відбувається хронізація процесу та подальший перехід захворювання у стадію фіброзоутворення, що супроводжується посиленням експресії та активності ММП2 [14]. Варто відмітити, що на фоні антрациклінової КП при тривалості експерименту близько 6 тижнів, активність цього ензиму перевищує таку у інтактних тварин майже у 1,5 рази [15]. Згідно вищевказаного можна припустити, що незначне посилення активності желатинази А у межах нашого експерименту являється черговим етапом поступового підвищення активності цієї протеїнази.

Застосування корвітину на тлі КП у щурів призводило до істотного зниження активності ММП9 ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з контрольною групою. Це узгоджується з даними інших дослідників, які показали, що кверцетин у мікромольній концентрації здатен напряму інгібувати ММП9 і натомість посилювати експресію ТІМП1 [16].

#### ВИСНОВКИ

1. За умов антрациклінової кардіопатії спостерігаються зміни активності желатиназ та трипсиноподібних ферментів, причому, ці протеолітичні системи функціонують незалежно.
2. Застосування корвітину призводить до зменшення мембраноушкоджуючої дії антрациклінових антибіотиків, але не впливає на активність трипсиноподібних ферментів крові та клітин.

3. Значне падіння активності ММП9 за умов застосування корвітину при антрацикліновому ушкодженні міокарду у щурів може свідчити про зниження інтенсивності процесів ремоделювання у серцевому м'язі.

#### Список літератури

1. Турна А.А. Матриксные металлопротеиназы и сердечно-сосудистые заболевания / Турна А.А., Торгузов Р.Т. // Артериальная гипертензия. – 2009. – Т. 16, № 6. – С. 532-538.
2. Tang Q.D. Plasma matrix metalloproteinases-2 and -9 levels are elevated in patients with acute coronary syndrome and coronary chronic total occlusion / Tang Q.D., Wu P.S., Hou Y.Q. et al. // 2009. – V. 29, № 5. – P. 1004-1007
3. Craciunescu I. Changes in plasma levels of MMP-9, MMP-7 and their inhibitors in patients with coronary artery disease / Craciunescu I., Serban M., Iancu M. et al. // Rom J Intern Med. – 2010. – V. 48, № 2. – P. 141-149.
4. Билык О.В. Биофлавоноид кверцетин и перспективы его использования в медицине / Билык О.В., Рыбальченко В.К., Романюк Б.П. // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2007. – Т. 2, № 1. – С. 4-7.
5. Saragusti A.C. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of the flavonoid-enzyme interaction / Saragusti A.C., Ortega M.G., Cabrera J.L. et al. // Eur J Pharmacol. – 2010. – V. 10. – P. 138-145.
6. Капелько В.И. Метаболические и функциональные основы экспериментальных кардиомиопатий / Капелько В.И., Попович М.И. // Кишинев: Штиинца. – 1990. – С. 6-56.
7. Troeberg L. Current Protocols in Protein Science / Troeberg L., Nagase H. – 2003; 21.15.
8. Мохорт М.А. Кардіотоксичні ефекти доксорубіцину і доцільність їх фармакологічної корекції антагоністами кальцію дигідропіридинового ряду та активаторами АТФ-чутливих калієвих каналів гуанідового ряду / Мохорт М.А., Серединська Н.М., Киричок Л.М. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – Т. 4, № 17. –
9. Калинкина Н.В. Патогенез антрациклиновых повреждений сердца / Журн. АМН України. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 238–251.
10. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун // М.: Медицина. – 2002. – 541с.
11. Билык О.В. Биофлавоноид кверцетин і перспективи його використання в медицині / Билык О.В., Рыбальченко В.К., Романюк Б.П. // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2007. – Т. 2, № 1. – С. 4-9.
12. Куликов В.Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани / Куликов В.Ю. – Эл. журнал НГМУ «Медицина и образование в Сибири». – 2009. – № 4.
13. Wang, W. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury / Wang, W., Schulze C.J., Suarez-Pinzon W.L. et al. // Circulation. –2002. –V. 106. – P. 1543-1549.
14. Matsumoto Y. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, but Not MMP-2, Is Involved in the Development and Progression of C Protein-Induced Myocarditis and Subsequent Dilated Cardiomyopathy / Matsumoto Y., Park Il-Kwon, Kohyama K. // J Immunol. – 2009. – V. 183. – P. 4773-4781.
15. Гордієнко Ю.А. Зміни активності желатиназ у щурів з антрацикліновою кардіопатією при застосуванні нестероїдних протизапальних засобів та кверцетину / Гордієнко Ю.А., Чернов Є.А., Мамчур В.Й. та ін. // Біологічні студії. – 2010. – Т. 4, № 3. – С. 23-30.
16. Wang L Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice // Wang L, Wang B, Li H. et al. // Eur J Pharmacol. – 2012. –V. 690, № 1. – P. 133-141.

Гордиенко Ю.А. Влияние корвитина на активность протеолитических ферментов у крыс с антрациклиновой кардиопатией / Ю.А. Гордиенко, А.А. Кулинич, О.Э. Шаульская, А.И. Шевцова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С.26-33.

Проведено исследование активности трипсиноподобных ферментов (ТПА) и матричных металлопротеиназ ММП2 и ММП9 у крыс с доксорубицин-индуцированной кардиопатией и оценено влияние корвитина на их активность. Экспериментально доказано повышение активности обозначенных ферментов в крови при использовании доксорубицина. Под действием корвитина ТПА не восстанавливалась, а активность ММП2 и ММП9 снижалась, причем активность ММП9 была ниже нормы. В сердечной мышце ТПА не уменьшалась, а при использовании корвитина восстанавливалась практически до нормальных значений. Сделан вывод о независимом функционировании трипсиноподобных ферментов и желатиназ А и В при антрациклиновой кардиопатии. Полученные данные позволяют предположить, что одним из механизмов кардиотерапевтического эффекта корвитина является снижение активности желатиназы В.

**Ключевые слова:** антрациклиновые антибиотики, доксорубицин, желатиназы А и В, трипсиноподобные ферменты.

Gordiyenko Yu.A. Impact of corvitin on proteolytic enzymes activity in rats with anthracycline cardiopathy / Yu.A. Gordiyenko, A.O. Kulinich, O.E. Shaulska, A.I. Shevtsova // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 26-33.

Activity of trypsin-like enzymes (TLA) and matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 in rats with doxorubicin-induced cardiopathy were investigated and effect of quercetin on their activity was estimated. Increased activity of the indicated enzymes in blood of rats treated with doxorubicin was proved. It is revealed that TLA was not restored under the action of corvitin, activity of MMP2 and MMP9 decreased, in addition MMP9 activity was less than normal values. TPA decreased in cardiac muscle, and under the treatment of corvitin it was restored almost to norm. A conclusion about the independent functioning of trypsin-like enzymes and gelatinases A and B in anthracycline cardiopathy was made. Data obtained suggest that one the mechanisms of cardiotherapeutical effect of corvitin is reducing of gelatinase B activity.

**Keywords:** anthracycline antibiotics, doxorubicin, gelatinases A and B, trypsin-like enzymes.

*Поступила в редакцию 12.11.2012 г.*