

С. В. Позднякова¹, О. Р. Грек¹, Р. А. Жоголь¹,
И. В. Шарапов¹, В. И. Шарапов¹, И. В. Сорокина², Т. Г. Толстикова²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный просп., 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
просп. Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: pozdnyakovas@ngs.ru

АКТИВНОСТЬ МОНООКСИГЕНАЗ ПЕЧЕНИ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ АМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Проведено исследование эффектов синтезированных тритерпеноидов, таких как бетулоновая кислота и два ее амида, содержащих фрагмент β-аланина у С28: 3-[3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-аминопропионовая кислота и ее метиловый эфир на активность P-450IIIА4, P-450IIС и P-450IIE1 цитохромов у интактных крыс и животных с цитостатическим повреждением. Показан полиморфизм в чувствительности определенных изоформ P-450 цитохрома микросом печени у интактных крыс на фоне введения бетулоновой кислоты и ее амидов. Метиловый эфир амида бетулоновой кислоты имел меньший эффект по сравнению с 3-[3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-аминопропионовой кислотой. Применение бетулоновой кислоты и ее амидов на фоне высокодозной цитостатической терапии увеличивало активность угнетенных изоформ цитохрома P-450 микросом.

Ключевые слова: печень, монооксигеназы, бетулоновая кислота.

На основе бетулоновой кислоты (БК), 3β-оксо-20(29)-лупен-28-овой, получены ее амидные производные, содержащие в С28 положении остатки β-аланина: [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота (АБК) и метиловый эфир [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты (МЭАБК) [1]. В предыдущих экспериментах установлено, что данные агенты относятся к малотоксичным соединениям и обладают антиоксидантными, кардио-, гепато- и нефропротекторными свойствами [2–4]. К тому же [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота увеличивает противоопухолевую и антиметастатическую активность цитостатиков на фоне снижения их токсических проявлений [5; 6]. Для реализации всех перечисленных фармакологических эффектов недостаточно обладать только антиоксидантными свойствами.

Известно, что монооксигеназная система, участвуя в метаболических превращениях противоопухолевых препаратов, играет значительную роль в реализации их фармакологического действия, увеличение или уменьшение ее активности приводит к из-

менению токсического и лечебного действия цитостатических препаратов [7; 8]. В связи с этим было предположено, что данные агенты должны обладать направленной регуляцией печеночных монооксигеназ.

Цель исследования: оценить активность некоторых изоформ микросомальных ферментов печени у интактных животных и после однократного введения комплекса цитостатиков на фоне курсового введения бетулоновой кислоты и ее аланинамидных производных.

Материал и методы

Исследования проведены на 500 крысах самках вистар массой 180–200 г. Синтез и подтверждение структуры 3β-оксо-20(29)-лупен-28-овой (БК), [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты (АБК) и метилового эфира [3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовой кислоты (МЭАБК) осуществляли в Новосибирском институте органической химии СО РАН [1]. Изучаемые агенты вводили внутривенно в дозах 50 мг/кг в водно-твиновом растворе. Животные контрольных

групп получали эквивалентное количество водно-твинового раствора (твин-40). В группах однократного введения животные получали препараты за 6 часов до забора материала. В группах курсового применения изучаемые агенты вводили в течение 7-и и 14-и суток ежедневно как интактным животным, так и животным через сутки после цитостатического воздействия.

Комплекс противоопухолевых препаратов вводили однократно внутривентриально в дозах, равных 1/5 ЛД₅₀, рассчитанных методом графического пробит-анализа: циклофосфан – 21 мг/кг, доксорубин – 2,1 мг/кг, винкристин – 0,04 мг/кг, преднизолон – 2,1 мг/кг массы тела.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [9].

Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием. Каталитическую активность цитохромов P-450_{1C}, P-450_{1A4} и P-450_{1E1} определяли по скорости нарастания продуктов катаболизма, характерных для данных изоформ субстратов – амидопирин, эритромицин и анилина соответственно. Скорость N-деметилирования амидопирин и эритромицин оценивали по скорости нарастания формальдегида [10]. Каталитическую активность P-450_{1E1} определяли по скорости образования p-аминофенола в реакции p-гидроксилирования анилина [11]. Скорость N-деметилирования амидопирин и эритромицин, p-гидроксилирования анилина выражали в нмолях соответствующего метаболита за 1 мин на 1 мг микросомального белка [12].

Статистическую обработку данных проводили методом параметрической статистики с использованием персонального компьютера.

Результаты исследования и обсуждение

БК-производные через 6 ч после их однократного энтерального введения способствовали индукции микросомальных ферментов, принимающих участие в метаболизме амидопирин, эритромицин и анилина (табл. 1). Больше всего ускорился метаболизм при применении БК и АБК (по амидопирину в 1,79 и 1,81 раза, по эритромицину в 1,56 и 1,57 раза, по анилину в 1,64 и 1,65 раза соответственно). Тогда как при применении МЭАБК увеличение скорости метаболизма всех изучаемых субстратов было более низким, чем в предыдущих группах (см. табл. 1).

При курсовом способе введения БК и АБК увеличивали каталитическую активность цитохромов P-450 по способности N-деметилировать амидопирин и эритромицин на протяжении всего срока исследования. Активирующее влияние самой БК на p-гидроксилирование анилина в микросомах печени при увеличении срока введения ослабевало, к 14-м суткам имела место нормализация ранее повышенной активности P-450_{1E1}. Тогда как на фоне длительного введения ее аланинамидных производных (АБК и МЭАБК) восстановления активности данной изоформы цитохрома не наблюдали (табл. 2). Более того, с увеличением времени введения АБК наблюдали тенденцию к дальнейшему увеличению каталитической активности всех изучаемых ферментов. В противоположность АБК при введении МЭАБК в N-деметилазной активности по эритромицину наблюдали иного рода тенденцию: некоторое падение активности указанных ферментов при увеличении курса, но без нормализации. Скорость метаболизма эритромицин на фоне МЭАБК к 14-м суткам снизилась на 28 % относительно такового показателя на 7-е сутки, но продол-

Таблица 1. Активность микросомальных ферментов печени крыс через 6 часов после однократного энтерального введения БК-производных

Группы животных	N-деметилирование		P-гидроксилирование анилина
	амидопирин	эритромицин	
1. Интактные	2,15 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,83 ± 0,01
2. БК	3,71 ± 0,16 ¹	0,84 ± 0,02 ¹	1,36 ± 0,01 ¹
3. АБК	3,9 ± 0,12 ¹	0,85 ± 0,02 ¹	1,37 ± 0,06 ¹
4. МЭАБК	2,55 ± 0,10 ^{1,2,3}	0,63 ± 0,04 ^{2,3}	1,18 ± 0,07 ^{1,2}

Примечание: ^{1,2,3} – достоверность отличия между группами животных с соответствующим номером при p < 0,05.

Таблица 2. Активность микросомальных ферментов печени при курсовом введении БК-производных

Сроки введения препаратов	Интактные	БК	АБК	МЭАБК
		N-деметилирование амидопирина		
7-е сутки	2,15 ± 0,01	2,88 ± 0,20*	2,90 ± 0,10*	2,42 ± 0,18
14-е сутки	2,15 ± 0,01	2,93 ± 0,14*	3,10 ± 0,36*	2,64 ± 0,23*
		N-деметилирование эритромицина		
7-е сутки	0,54 ± 0,01	0,73 ± 0,05*	0,71 ± 0,05*	0,85 ± 0,02*
14-е сутки	0,54 ± 0,01	0,68 ± 0,02*	0,74 ± 0,05*	0,61 ± 0,02* [#]
		p-гидроксилирование анилина		
7-е сутки	0,83 ± 0,01	0,88 ± 0,01*	0,96 ± 0,04*	0,98 ± 0,02*
14-е сутки	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,07	1,02 ± 0,05*	1,03 ± 0,01*

Примечание: * – достоверные отличия относительно интактных животных; [#] – достоверные отличия относительно данных к 7-м суткам соответствующей группы.

Таблица 3. Длительное введение БК-производных после цитостатического повреждения

Сроки введения препаратов	Группы животных				
	Интактные	ПХТ	ПХТ + БК	ПХТ + АБК	ПХТ + МЭАБК
	1	2	3	4	5
		N-деметилирование амидопирина			
7-е сутки	2,15 ± 0,01*	1,81 ± 0,05	2,53 ± 0,13 ²	2,52 ± 0,24 ²	2,28 ± 0,25
14-е сутки	2,15 ± 0,01	2,07 ± 0,02	2,66 ± 0,18 ²	2,93 ± 0,39 ²	2,75 ± 0,38
		N-деметилирование эритромицина			
7-е сутки	0,54 ± 0,01	0,42 ± 0,01 ¹	0,56 ± 0,06 ²	0,59 ± 0,02 ²	0,79 ± 0,30
14-е сутки	0,54 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,53 ± 0,04 ²	0,62 ± 0,04 ²	0,65 ± 0,02 ²
		p-гидроксилирование анилина			
7-е сутки	0,83 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,74 ± 0,04	1,05 ± 0,06 ²	0,71 ± 0,04 ²
14-е сутки	0,83 ± 0,01	0,85 ± 0,03	0,85 ± 0,05	1,03 ± 0,06 ²	0,96 ± 0,02 ²

Примечание: * – достоверные отличия относительно интактных животных; ^{1,2} – достоверность отличия между группами животных с соответствующим номером при p < 0,05.

жала превосходить исходные значения на 13 % (см. табл. 2).

Исследование активности МОС печени крыс после цитостатической терапии (группа 2, ПХТ) показало неравномерное ингибирование активностей различных изоформ цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ (табл. 3). Особенно выражены изменения в активности подсемейства Р-450ША4, определяемой по скорости N-деметилирования эритромицина. В данной реакции снижение активности ферментов продолжалось в течение всего срока наблюдения: на 22,2 и 24,1 % на 7-е и 14-е сутки эксперимента соответственно. Деструктивное воздействие комплекса цитостатиков на Р-450ПС было более кратковременным: активность данной изоформы хотя до конца не восстанавливалась, но повышалась на 14,4 % относительно 7-х суток. Каталитическая активность Р-450ПЕ1 не была затронута химиотерапевтическими противоопухолевыми препаратами (см. табл. 3).

На фоне введения БК-производных после цитостатической депрессии цитохромов

Р-450 регистрировали восстановление подавленной активности Р-450ША4 с 7-х суток исследования после БК и АБК терапии. На фоне МЭАБК активность данной изоформы превышала даже исходные значения на 46,3 и 20,4 % на 7-е и 14-е сутки наблюдения соответственно. Скорость N-деметилирования амидопирина восстанавливалась на фоне всех исследуемых соединений. Скорость p-гидроксилирования анилина возросла относительно интактных животных на фоне применения АБК на 26,5 и 24,1 % на 7-е и 14-е сутки соответственно. Что касается МЭАБК, то на фоне данного препарата на 7-е сутки наблюдали угнетение Р-450ПЕ1 на 14,5 % с последующей активацией данной изоформы цитохрома Р-450 на 35,2 % относительно 7-х суток. Данный показатель превышал интактные значения на 15,7 %.

Можно предположить, что мозаичность в нарушении скорости лекарственного метаболизма на различных изоформах цитохромов связана с локализацией данных цитохромов и их распространенностью в пе-

чени. Известно, что Р-450ША4 локализован преимущественно в центролобулярной области печени [13]. Это согласуется с тем, что при интоксикации данным комплексом цитостатиков в печени крыс преобладали деструктивные изменения гепатоцитов, прежде всего в области центральной вены [2]. Соответственно эти деструктивные изменения гепатоцитов должны сопровождаться нарушением функции мембраносвязанных ферментов эндоплазматического ретикулума. К тому же цитохром Р-450ША4 обладает низкой устойчивостью к перекисному окислению липидов, в связи с чем его количество может снижаться при противоопухолевой терапии, которая сопровождается активацией процессов перекисного окисления [14] и активацией лизосомальных ферментов [15]. БК-производные обладая выраженными антиоксидантными свойствами, улучшают состояние мембран эндоплазматического ретикулума и соответственно мембраносвязанных ферментов [14].

Заключение

Изученные тритерпеноиды как при однократном, так и при курсовом введении, активируют химические реакции, катализируемые изоформами цитохромов: Р-450ПС, Р-450ША4 и Р-450ПЕ.

При однократном введении интактным животным изучаемых полусинтетических тритерпеноидов лупанового ряда, полученные результаты демонстрируют неоднозначную зависимость между активностью молекулы и ее химическим строением. Амид с β -аланином бетулоновой кислоты (АБК) в большей степени, чем другие агенты, индуцирует исследуемые монооксигеназы печени. Метилирование карбоксильной группы бетулоновой кислоты (МЭАБК) приводит к некоторой потере способности длительно поддерживать активность монооксигеназ на высоком уровне.

Данные по метаболизму амидопирин, эритромицина и анилина *in vitro* свидетельствуют о нарушениях в системе цитохромов Р-450 печени под воздействием комплекса вводимых цитостатических препаратов: циклофосфана (циклофосфамида), доксорубина, винкристина и преднизолон. Наиболее сильно была затронута N-демети-

лазная активность изофермента Р-450ША4, тогда как Р-450ПЕ1 продемонстрировала инертность к деструктивному действию комплекса противоопухолевых препаратов.

Все исследуемые БК-производные ликвидируют ингибирующее влияние ПХТ на систему цитохромов и улучшают детоксицирующую функцию цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ печени (Р-450ПС, 450ША4) у крыс после однократного введения комплекса цитостатиков.

Список литературы

1. *Синтез* производных бетулоновой кислоты, содержащих аминокислотные фрагменты / Н. И. Петренко, Н. В. Еланцева, В. З. Петухова и др. // Химия природных соединений. 2002. № 4. С. 276–283.
2. *Эффективность* бетулоновой кислоты и ее аланинамидных производных при восстановлении паренхимы печени крыс в постцитостатический период / О. Р. Грек, С. В. Позднякова, А. П. Надеев и др. // Эксперим. и клин. фармакология. 2005. Т. 68, № 6. С. 49–51.
3. *Бетулоновая* кислота и ее аланинамидное производное – перспективные органопротекторы при химиотерапии опухолей / С. В. Позднякова, О. Р. Грек, И. В. Сорокина и др. // Журн. эксперим. и клин. медицины. 2005. № 4. С. 53–59.
4. *Изучение* антиоксидантных свойств производных бетулоновой кислоты на модели острого токсического гепатита / И. В. Сорокина, Т. Г. Толстикова, Е. Б. Бубнова и др. // Науч. вестн. Тюмен. мед. акад. 2003. № 1. С. 60–61.
5. *Бетулоновая* кислота и ее производные – новая группа агентов, снижающих побочное действие цитостатиков / И. В. Сорокина, Т. Г. Толстикова, Н. А. Жукова и др. // Докл. Академии наук. 2004. Т. 399, № 2. С. 1–4.
6. *Изучение* влияния бетулоновой кислоты и ее амидных производных на рост и метастазирование перевиваемых опухолей у мышей / И. В. Сорокина, Н. А. Жукова, Т. Г. Толстикова и др. // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2006. № 1. С. 29–31.
7. *Активность* неспецифических оксидаз печени и биологические эффекты противоопухолевых препаратов / Т. А. Богуш,

А. Б. Сыркин, А. Ф. Бухны и др. // Вестн. АМН. 1981. № 7. С. 34–41.

8. *Поспелова Т. И., Нечунаева И. Н.* Типы метаболизма при гемобластозах. Новосибирск, 2004.

9. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: приложение к приказу № 755 Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977. М., 1977.

10. *Nash T.* The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Nashzsch reaction // *Biochem. J.* 1953. Vol. 55, № 4. P. 416–421.

11. *Imai Y. et al.* Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction / Y. Imai, F. Ito, R. Sato // *J. Biochem.* 1966. Vol. 60, № 4. P. 417–425.

12. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.

13. *The immunochemical* localization and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450 / G. I. Murray, T. S. Barnes, H. F. Sewell et al. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988. Vol. 25. P. 465–475.

14. *Жоголь Р. А.* Нарушение метаболизма ксенобиотиков в печени при введении цитостатиков и их коррекция производными бетулина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2006.

15. *Грек О. Р. и др.* Протективное действие энтеросгеля на лизосомы печени крыс при введении комплекса цитостатических препаратов / О. Р. Грек, С. В. Мишенина, А. Б. Пупышев // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2002. Т. 134, № 10. С. 413–417.

Материал поступил в редколлегию 10.07.2006

S. V. Pozdnyakova, O. R. Grek, R. A. Zhogol, I. V. Sharapov, V. I. Sharapov,
I. V. Sorokina, T. G. Tolstikova

Activity hepatic monoxygenases and biology effects of betulonic acid and its amides

Estimation of effects of synthetic triterpenoids, such as betulonic acid and its two amides, containing β -alanine at C28: 3-[3-oxo-20(29)-lupen-28-oul]-aminopropionic acid and its methyl ether were studied on activity P-450III_{A4}, P-450II_C and P-450II_{E1} cytochromes in normal and cytostatics-treated rat. Polymorphism in sensitivity of specific form hepatic microsomal P-450 cytochrome were shown in normal rats by administration the betulonic acid and its amides. Methyl ester failed to demonstrate an activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes comparison of those with 3-[3-oxo-20(29)-lupen-28-oul]-aminopropionic acid. Applications of the betulonic acid and its amides in high-dose cytostatics-treated rats increase activity of reduction isoenzyme group microsomal cytochrome P-450.

Keywords: liver, monoxygenases, betulonic acid.