

АНАЛИЗ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПРОСТАГЛАНДИНА A₂

In vitro studies were carried out on isolated rat liver hepatocytes to examine cytoprotective effects of synthetic PGA₁ analogs using carbon tetrachloride (CCl₄) as the toxic agent. Cell damage was measured by cytoplasmic aspartate-aminotransferase and acid phosphatase release after 3 hours of CCl₄ influence. The results showed three prostanoids investigated had protective properties comparable with natural PGI₂, the most famous and efficient cytoprotector of prostanoid type. The most pronounced effect was observed, when analog U-34 having 2-oxo-4-amino-octenyl- α -chain and monounsaturated co-chain was used. It's determined that protective action didn't realize by modification of adenyllyl cyclase activity.

Простагландины (ПГ) представляют группу биологически активных липидов, вовлеченных в регуляцию физиологических и патологических процессов в организме млекопитающих [1]. Функционирование ПГ в печени обеспечивает контроль за ее регенерацией и углеводным обменом, а также за развитием адекватных защитных реакций данного органа [2]. Так, известно, что ПП₂, ПГЕ₂, ПГФ_{2 α} , 16,16-диметилПГЕ₂ способны частично или полностью предотвращать острое повреждение печени, вызванное действием ССЦ, D-галактозамина, вируса гепатита, а также гипотермической ишемией и другими факторами химической и физической природы [1, 2]. При этом гепатопротекторные эффекты ПГ наблюдаются как в экспериментах на изолированной печени и культуре гепатоцитов, так и при действии поражающего фактора на цельный организм, что предопределяет возможность использования ПГ и их аналогов для лечения вирусного гепатита, цирроза печени и острой печеночной недостаточности [2, 3].

Вместе с тем низкая биологическая селективность природных ПГ, проявляющаяся в развитии ряда побочных эффектов (головная боль, гипотензия, диарея), а также высокая скорость их биотрансформации и инактивации ограничили использование природных ПГ в клинической медицине [3]. В связи с этим создание синтетических ПГ, обладающих выраженным гепатопротекторным действием и высокой стабильностью *in vivo*, а также анализ молекулярных путей реализации их биологической активности - одни из актуальных задач современной биохимии и фармакологии.

Целью настоящей работы явилось изучение цитопротекторных свойств синтетических аналогов ПГА₂ в модели ССЦ₄-индуцированного поражения печени *in vitro*.

Материал и методика

В работе был использован ПГ₂ и следующие простаиноиды: **Ю-9** - 2-метил-4-(3-бутил-изоксазолин-5-ил)-метил-5-(7-оксигептил)-2-циклопентен-1-он; **Ю-10** - 3-изобутоксид-4-(6-карбоксихексил)-2-метил-5-(3-бутил-изоксазолин-5-ил)-метил-2-циклопентен-1-он; **Ю-13** - 4-(3-бутил-изоксазолин-5-ил)-метил-5-(6-карбоксихексил)-2-метил-2-циклопентен-1-он; **Ю-26** - 3-изобутоксид-2-метил-5-(2-оксо-4-амино-окт-3(Е)-енил)-4-(гидроксигепт-2(З)-енил)-2-циклопентен-1-он; **Ю-34** - 3-изобутоксид-2-метил-5-(2-оксо-4-амино-окт-3(Е)-енил)-4-(6-карбоксихекс-2(З)-енил)-2-циклопентен-1-он; **Ю-39** - 2-метил-4-(3-бутилизоксазол-5-ил)-метил-5-[6-метил-карбоксихекс-2(З)-енил]-2-циклопентен-1-он. Перечисленные аналоги синтезированы [4, 5] и переданы для исследований лабораторией химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Гепатоциты были выделены из печени крыс-самцов линии Вистар перфузионным методом, как описано в [6]. В качестве среды для перфузии использован раствор Рингера - Локка следующего состава: 0,9 % NaCl, 0,01 % NaHCO₃, 0,042 % KCl, 0,07 % цитрата Na и глюкозы (1 мг/мл). Среда выделения гепатоцитов включала 10 ммоль/л Hepes-NaOH (pH 7,5), 0,02 % альбумина, а также все компоненты раствора Рингера - Локка. Гепатоциты отделяли от других клеток печени путем 3-кратного центрифугирования при 70 g в течение 3 мин.

После выделения гепатоциты (10-12 млн клеток) суспендировали в среде ДМЕМ («Sigma» Chemical Co.) с добавлением 0,5 % альбумина, 0,1 % глюкозы,

100 ед./мл пенициллина, 0,25 мг/мл стрептомицина и инкубировали при постоянном встряхивании, поддерживая температуру 37 °С. Жизнеспособность гепатоцитов оценивали по включению трипанового синего.

Введению ССЦ в исследуемые образцы предшествовал 1-часовой адаптационный период. ССЦ₄ в виде 20 % раствора в этаноле добавляли к опытным пробам в нулевой момент времени до конечной концентрации 0,5 %. Контрольные пробы содержали эквивалентное количество этанола (0,3 %). Исследуемые простагоиды в концентрации $10^{-10} \div 10^{-6}$ моль/л добавляли к опытным пробам через 30 мин после ССЦ. Синтез эндогенных ПГ подавляли ацетилсалициловой кислотой (40 мкг/мл клеточной суспензии) в соответствии с рекомендациями [2].

После 3-часовой инкубации в присутствии ССЦ 1 мл клеточной суспензии отбирали и использовали для определения ферментативной активности в супернатанте после 3-минутного центрифугирования при 70 g (6 °С). Активность аспаратаминотрансферазы (АспАТ) и кислой фосфатазы измеряли по [7], внутриклеточное содержание цАМФ определяли по методике [8]. Полный выход ферментов из гепатоцитов устанавливали после обработки клеточной суспензии детергентом Triton X-100 в конечной концентрации 1,0 % (по результатам предварительных экспериментов). Высвобождение внутриклеточных ферментов в каждом варианте рассчитывали согласно [2] как процент к максимально возможному - индекс цитотоксичности:

$$\text{Индекс цитотоксичности} = \frac{\text{Высвобождение фермента в опытной пробе}}{\text{Максимальное высвобождение фермента}} \cdot 100\%.$$

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью пакета программ Stadia 6.0.

Результаты и их обсуждение

В предварительных экспериментах была определена динамика развития цитотоксического эффекта ССЦ₄. Относительно высокая доза данного токсиканта (0,5 %) вызывала значительное, возрастающее во времени повреждение плазматических мембран и лизосом гепатоцитов, оцениваемое по высвобождению АспАТ и кислой фосфатазы соответственно. Выброс указанных ферментов из клеточных структур, начавшийся в первые минуты воздействия ССЦ, выходил на максимум через 90 мин и оставался относительно постоянным на протяжении 3 ч от начала инкубации. Полученные результаты хорошо коррелировали с данными трипанового теста и полностью соответствовали данным литературы [3]. Индекс цитотоксичности, оцененный по истечении указанного времени, составил $66,6 \pm 5,4$ % для АспАТ и $47,8 \pm 3,4$ % для кислой фосфатазы.

Исследуемые ПГ и аналоги вносили в клеточную суспензию через 30 мин после обработки гепатоцитов токсикантом. Изучение цитопротекторных свойств аналогов ПГА₂ на описанной модели позволило установить, что все исследованные соединения в разной степени проявляли способность предотвращать повреждение плазматических мембран гепатоцитов, вызванное ССЦ и оцененное по выходу из клетки цитоплазматической АспАТ (табл. 1). По силе протекторного действия в максимально эффективной концентрации аналоги образуют следующий ряд активности: Ю-34 > Ю-9 > ПГА₂ > Ю-26 > Ю-13 > Ю-39 > Ю-10.

Структурно-функциональный анализ позволил установить, что возможный защитный эффект проявляло соединение Ю-34, характеризующееся наличием 2-оксо-4-аминооктенильной ос-цепи и мононенасыщенной ω-цепи. Данный аналог снижал цитотоксический эффект ССЦ₄ практически в два раза в диапазоне концентраций $10^{-9} \div 10^{-7}$ моль/л. Введение изоксазолиновой группы в ω-цепь и гидроксильной группы в α-цепь простагоида, а также кетогруппы по С₂- и аминогруппы по С₄-положению α-цепи аналога привело к ослаблению цитопротекторного действия соединений Ю-9 и Ю-26 и проявлению ими способности снижать токсический эффект всего лишь на 36 % при концентрации 10^{-7} и 10^{-8} моль/л соответственно. Интересно, что превышение указанных доз не только не оказывало цитопротекторного эффекта, но и вызывало некоторое усиление повреждения клеток. Конверсия защитных эффектов ПГ при исполь-

зовании их в концентрациях, превышающих 10^{-7} моль/л, описана [2] и объясняется превышением физиологических доз исследуемых соединений. Необходимо отметить, что выраженность защитного действия аналогов Ю-34, Ю-26 была сопоставима с эффектом ПГ₂ - наиболее сильного природного гепатопротектора простагландинового ряда - и превышала протекторное действие природного ПГА₂ (см. табл. 1). Аналог Ю-10, содержащий α -изоксазолиновую группу, защитным действием не обладал.

Известно, что важную роль в развитии CCl₄-индуцированного поражения клеток играют лизосомы [9]. Высвобождаемые из них гидролитические ферменты вызывают автопереваривание клеточных компонентов и стимулируют развитие цирроза печени [10]. Таким образом, с целью установления возможности вовлечения лизосом в развитие цитотоксического эффекта CCl₄ и цитопротекторного действия простаноидов нами была проведена оценка эффективности

влияния упомянутых соединений на утечку кислой фосфатазы - маркерного фермента лизосом. Как свидетельствуют данные табл. 2, аналог Ю-9 наиболее эффективно предотвращает выход данного фермента из лизосом. Использование его в концентрации 10^{-7} моль/л снижало поражающий эффект CCl₄ на 22 %. Аналог Ю-26 в той же концентрации уменьшал повреждение мембран лизосом на 18 %. Соединения Ю-13 и Ю-39 защитного действия не проявили. Общий ряд активности простаноидов в данном тесте можно представить следующим образом: ПГ₂ > Ю-9 > ПГА₂ > Ю-26 > Ю-34 > Ю-10 > Ю-39 > Ю-13 (см. табл. 2).

С учетом способности ряда исследуемых аналогов модифицировать активность аденилатциклазы плазматических мембран гепатоцитов [11], а также потенциальной возможности реализации цитопротекторного эффекта гетеропростаноидов по цАМФ-зависимому пути нами была проведена серия экспериментов по измерению содержания цАМФ в клетках, подвергнутых действию CCl₄ и тестируемых аналогов.

Установлено, что действие гетеропростаноидов на аденилатциклязную систему зависело от времени введения аналога в среду инкубации. Так, в случае обработки гепатоцитов простаноидами перед внесением CCl₄ воздействие исследуемых соединений на синтез цАМФ оказалось недостоверным (табл. 3). В то же время наблюдающееся повышение активности аденилатциклазы в присутствии аналогов Ю-9, Ю-39 и Ю-13, введенных спустя 30 мин после CCl₄, не коррелировало со степенью выраженности гепатопротекторного действия указанных простаноидов. Полученные данные позволяют исключить воз-

Таблица 1

**Цитопротекторные свойства аналогов ПГА₂,
оцененные по выходу цитоплазматической АСТ**

Аналог	Концентрация аналога в реакционной смеси, моль/л				
	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
	Коэффициент цитотоксичности, %				
ПГ ₂	64,4±2,8	58,9±2,9	51,7±3,9	47,1±3,7	59,2±4,8
ПГА ₂	56,2±1,9	54,8±3,2	50,9±1,8*	49,0±1,2*	64,2±0,8
Ю-9	71,0±4,2	50,6±2,4*	46,6±3,7*	43,5±4,6*	63,5±3,5
Ю-10	71,4±4,5	69,0±3,2	63,0±4,6	61,2±2,3	63,1±5,4
Ю-13	54,3±6,1*	53,9±3,5*	51,8±2,9*	59,0±2,9	58,7±3,6
Ю-26	66,4±4,1	66,0±4,9	44,5±5,7*	48,7±3,1*	65,9±2,7
Ю-34	45,0±3,7*	34,8±3,9*	34,6±5,2*	31,9±2,7*	51,5±4,6*
Ю-39	61,0±4,8	60,9±6,1	56,7±3,2*	62,2±2,9	66,7±5,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 (*) – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n=4$). Достоверность рассчитана по отношению к эффекту CCl₄. Простаноиды внесены в среду инкубации через 30 мин после обработки клеток CCl₄.

Коэффициент цитотоксичности для CCl₄ составил 66,6±5,4 %.

Таблица 2

**Цитопротекторные свойства аналогов ПГА₂,
оцененные по выходу кислой фосфатазы**

Аналог	Концентрация аналога в реакционной смеси, моль/л				
	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
	Коэффициент цитотоксичности, %				
ПГ ₂	36,2±2,1	34,7± 2,8	30,1±1,7	28,5±3,1	32,3±2,0
ПГА ₂	43,3±2,6	34,0±1,5	27,7±1,1*	31,2±3,1*	35,5±2,5
Ю-9	38,2±6,0	33,4±2,4*	32,5±3,6*	25,3±2,7*	40,6±0,9*
Ю-10	45,8±3,7	44,9±2,8	43,5±4,9	34,6±5,7*	46,0±1,2
Ю-13	44,0±3,6	46,3±2,4	43,7±3,6	46,1±1,9	49,1±1,4
Ю-26	32,9±6,1	30,9±3,1*	30,5±4,4*	29,2±2,7*	35,3±3,7
Ю-34	36,1±3,4	36,8±5,2	35,5±4,1*	34,3±2,8*	33,3±1,7*
Ю-39	41,9±3,7	40,4±2,9	42,4±3,1	40,4±2,4	43,5±1,9

Примечание. Коэффициент цитотоксичности для CCl₄ составил 47,8±3,4 %.

возможность реализации защитного эффекта простаноидов через аденилатциклязную систему сигнальной трансдукции.

Таблица 3

Влияние синтетических аналогов ПГА на внутриклеточный уровень цАМФ в гепатоцитах в модели острого отравления CCl_4

Аналог	Содержание цАМФ, пМоль/10 млн клеток	
	ПГ введены в систему за 15 мин до CCl_4 $X \pm S_x$	ПГ введены в систему через 30 мин после CCl_4 $X \pm S_x$
Контроль	25,0 ± 1,7 (100 %)	25,0 ± 1,7 (100 %)
CCl_4 (0,5 %)	20,2 ± 4,1 (81 %)	20,9 ± 7,4 (84 %)
Ю-9	18,0 ± 1,5 (88 %)	29,9 ± 0,9 (121 %)*
Ю-10	22,1 ± 3,4 (88 %)	24,8 ± 3,6 (99 %)
Ю-13	19,6 ± 3,4 (79 %)	29,1 ± 2,4 (116)*
Ю-26	19,9 ± 2,7 (80 %)	24,8 ± 1,4 (99 %)
Ю-34	19,4 ± 2,7 (78 %)*	23,0 ± 4,2 (92 %)
Ю-39	20,3 ± 4,7 (81 %)	28,7 ± 2,4 (115 %)*
ПГ ₂	21,3 ± 3,9 (85 %)	25,4 ± 3,0 (102 %)

Примечание. Все простаноиды использованы в концентрациях, обеспечивающих максимальный защитный эффект (аналоги Ю-9, Ю-10, Ю-34 – 10^{-7} моль/л, аналоги Ю-13, Ю-26, Ю-39 – 10^{-6} моль/л). Достоверность эффектов гетеропростаноидов рассчитана по отношению к действию CCl_4 ; * – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n=4$).

функции печени и экспрессируют все ферменты метаболизма ксенобиотиков, представляя собой наиболее близкую модель к условиям *in vitro*, обнаружение цитопротекторной активности в ряду аналогов ПГА₂ на описанной модели CCl_4 -индуцированного поражения печени свидетельствует о потенциальной возможности использования соединений указанной серии в качестве основы для создания фармакологических препаратов гепатопротекторного спектра.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б04-284), Государственной программы прикладных научных исследований Республики Беларусь «Биоанализ и диагностика» (проект № г. р. 20042447), ГПФИ Республики Беларусь «Биооргсинтез-2» (проект № г. р. 20012044), гранта ИНТАС - 4813.

1. Filip C., Ungureanu D., Nechifor C. et al. // Ref. Med. Chir. Soch. Med. Nat. 2003. Vol. 107. № 2. P. 388.
2. Guarner F., Fremont-Smith M., Prieto J. // Liver. 1985. № 5. P. 35.
3. Quiroga J., Prieto J. // Pharmac. Ther. 1993. Vol. 58. P. 67.
4. Лис Л.Г., Желдакова Т.А., Пап А.А. и др. // ЖорХ. 1992. Т. 28. № 9. С. 1854.
5. Литвинко Н.М., Кучуро С.В., Лис Л.Г. и др. // Весці НАН Беларусі. 1998. № 1. С. 59.
6. Berry N.M., Friend D.S. // J. Cell Biol. 1969. Vol. 43. № 3. P. 506.
7. Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis. New York, 1974. P. 495.
8. Губич О.И., Шолух М.В. // Вестн. Белорус. ун-та. 2003. Сер. 2. №2. С. 11.
9. Abraham P. // Indian J. Physiol. Pharmacol. 2004. Vol. 48. № 2. P. 206.
10. Vанд S., Myren J., Naess O. // Scand. J. Gastroenterol. 1988. Vol. 23. № 8. P. 931.
11. Губич О.И. // Сборник трудов молодых ученых НАН РБ. 2004. Т. 3. С. 132.
12. Stacey N.H., Priestly B.G. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1978. Vol. 45. P. 29.

Поступила в редакцию 25.10.05.

Оксана Игоревна Губич - аспирант кафедры биохимии. Научный руководитель - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ биохимии обмена веществ кафедры биохимии М.В. Шолух.

Татьяна Анатольевна Желдакова - кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Михаил Васильевич Шолух - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ биохимии обмена веществ кафедры биохимии.

Принимая во внимание способность ненасыщенных молекул ПГ функционировать в качестве «ловушки» алкильных, алкоксильных и гидроксильных радикалов, а также ингибировать активность цитохрома P₄₅₀, участвующего в метаболическом превращении CCl_4 [12], можно предположить, что в основе наблюдаемого явления лежит ослабление интенсивности свободнорадикальных процессов в мембранах гепатоцитов, что обеспечивает повышение их стабильности.

Учитывая тот факт, что гепатоциты в первичной суспензии проявляют типичные