

... БІОХІМІЯ ... BIOCHEMISTRY ...

УДК: 616.12-05-06; 517.112:612.8

Розподіл гіалуронат-зв'язуючої активності білків у головному мозку щурів за дії доксорубіцину Я.В.Бабець, Г.О.Ушакова

*Дніпропетровський національний університет імені О. Гончара (Дніпропетровськ, Україна)
kristalxx@yandex.ru*

За допомогою твердофазного вуглевод-ферментного аналізу проведено дослідження гіалуронат-зв'язуючої активності білків у водорозчинній, мембранній та екстрацелюлярній фракціях, що екстраговані з чотирьох відділів мозку щурів лінії Вістар. Отримані дані показали, що за дії доксорубіцину змінюється афінність білків до гіалуронату, залежно від відділу головного мозку та клітинного компартменту, з найбільш вираженим ефектом у водорозчинній фракції із мозочку та екстрацелюлярній фракції із мозочку та гіпокампу. Застосування доксорубіцину на фоні дії α -кетоглутарату частково призвело до наближення гіалуронат-зв'язуючої активності білків до значень норми, однак не у всіх відділах мозку щурів.

Ключові слова: доксорубіцин, мозок, гіалуронова кислота, гіалуронат-зв'язуюча активність.

Распределение гиалуронат-связывающей активности белков в головном мозге крыс при действии доксорубицина Я.В.Бабец, Г.А.Ушакова

С помощью твердофазного углевод-ферментного анализа проведено исследование гиалуронат-связывающих свойств белков в водорастворимой, мембранной и экстрацеллюлярной фракциях, полученных из четырех отделов мозга крыс линии Вистар. Полученные данные показали, что при действии доксорубицина изменяется аффинность белков к гиалуронату в зависимости от отдела головного мозга и клеточного компартмента, с наиболее выраженным эффектом в водорастворимой фракции из мозжечка и экстрацеллюлярной фракции из мозжечка и гиппокампа. Применение доксорубицина на фоне действия α -кетоглутарата частично привело к приближению гиалуронат-связывающей активности белков к значениям нормы, однако не во всех отделах мозга крыс.

Ключевые слова: доксорубицин, мозг, гиалуроновая кислота, гиалуронат-связывающая активность.

The distribution of hyaluronan-binding activity of rats brain proteins under doxorubicin effect Ya.V.Babets, G.A.Ushakova

Using solid phase carbohydrate-enzyme analysis the study of hyaluronan-binding activity of brain proteins has been carried out in water-soluble, membrane and extracellular fractions obtained from different brain areas of Wistar rats. Doxorubicin has led to the change of protein affinity to hyaluronate depending on the area of brain and the cellular compartment, with the most pronounced effect in water-soluble fraction of cerebellum and extracellular fraction from cerebellum and hippocampus. The use of doxorubicin simultaneously with α -ketoglutarate has led partially to approximation of hyaluronan-binding proteins activity to the values of the norm but not in all areas of rats brain.

Key words: doxorubicin, brain, hyaluronic acid, hyaluronan-binding activity.

Вступ

З урахуванням останніх досягнень в глікобіології стає все більш популярним створення синтетичних гліканів – аналогів компонентів позаклітинного матриксу в якості потенційної мішені для лікування широкого спектру захворювань (Rowlands et al., 2015). Гіалуронова кислота є нессульфатованим глікозаміногліканом, що синтезується у внутрішньому просторі плазматичної мембрани, і синтезовані ланцюги цього глікозаміноглікану виштовхуються через «пороподібні»

структури у позаклітинний простір (Jiang et al., 2011). Частина гіалуронової кислоти залишається в клітині і є важливим структурним елементом цитозолу та має контакти з цитоскелетом клітини. Гіалуронова кислота входить до складу міжклітинного матриксу не тільки сполучної тканини, вона здатна з'єднуватися зі специфічними гіалуронат-зв'язуючими білками мозку, формуючи міжклітинні контакти й контакти типу клітина-матрикс (Itano et al., 2002; Mellor et al., 2013). Зокрема, фізико-хімічні властивості гіалуронової кислоти дозволяють їй виконувати роль резервуара для факторів росту та інших біологічно активних речовин, а, отже, забезпечувати тривалу взаємодію цих речовин з рецепторами клітинної поверхні і захищати їх від деградації. У зв'язку з цим гіалуронова кислота стала широко використовуватися для полегшення доставки лікарських речовин, у тому числі і доксорубіцину (протипухлинного антибіотику) (Xie et al., 2011; Yadav et al., 2007). Доставка препаратів через гематоенцефалічний бар'єр може вирішити ряд важливих питань у лікуванні пухлин мозку (Ananthanarayanan et al., 2011; Gupta et al., 2006). Однак зміни природної гіалуронат-зв'язуючої активності нервової тканини за впливу доксорубіцину у центральній нервовій системі досі не були вивчені. Відомо, що при застосуванні антрациклінових антибіотиків у пацієнтів або тварин спостерігається порушення когнітивних функцій, таких як концентрація, навчання, пам'ять, швидкість реакції та ін. (Moore, 2014; Dutta, 2011). На жаль, механізм дії доксорубіцину на мозок досліджений недостатньо. Яка роль самого доксорубіцину, його метаболітів або опосередкованої дії доксорубіцину на мозок, на сьогодні сказати важко. Одним з перспективних напрямків в зниженні токсичності доксорубіцину вважається застосування протекторів токсичності антрациклінових препаратів (Stërba et al., 2013). Серед них найбільш широко використовуються антиоксиданти (Бакланова, Ушакова, 2013). Раніше було показано, що α -кетокислоти інгібують окисне пошкодження реактивними сполуками кисню в культурі нейронів (Dakshayani, Subramanian, 2006), можуть знижувати вільний аміак (Tulsawani, Bhattacharya, 2006), мають нейропротекторну дію та ін. (Kovalenko et al., 2011). α -Кетоглутарат показав обнадійливі результати в поліпшенні метаболізму за впливу багатьох факторів клітин (Harrison, Pierzypowski, 2008), тому нами було запропоновано дослідити ефект α -кетоглутарату в якості коригуючої речовини побічних ефектів доксорубіцину на мозок. Отже, метою роботи було визначення характеру розподілення загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків мозку щурів за умов впливу доксорубіцину та α -кетоглутарату.

Методика та об'єкт дослідження

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Wistar вагою 210 ± 50 г. Тварин було поділено на 3 групи по 8 особин у кожній. До першої групи увійшли контрольні тварини, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину, у всіх інших була розвинена модель доксорубіцин-індукованої кардіопатії: щотижнево протягом чотирьох тижнів щурам вводили доксорубіцин (ДР) (ВАТ «Київмедпрепарат», Київ, Україна) у дозі 1 мг/кг: 2 група – тварини, що отримували ДР, 3 – ДР та α -кетоглутарат (0,5% Са-АКГ + 0,5% На-АКГ, хімічно-синтезована речовина, надана професором С.Г.Піержиновським, Lund University, Швеція) з питною водою протягом всього експерименту. Щодня тварини третьої групи вживали 43 мл питної рідини на 1 кг ваги. Тварин утримували за умов стандартного віварію із циклічністю світла 12 годин. Після закінчення 4 тижня експерименту всіх тварин декапітували з використанням тіопенталу натрію в дозі 60 мкг/кг згідно вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

З тканин гіпокампу, мозочку, кори великих півкуль та таламусу виділяли водорозчинну, мембранну та екстрацелюлярну фракції за допомогою диференціального центрифугування.

Гомогенізацію тканини мозку проводили в буфері: трис – 0,25 мМ (рН 7,4), ЕДТО – 1 мМ, дитіотрейтол – 2 мМ, ФМСФ – 0,2 мМ, NaN₃ – 3 мМ, у співвідношенні 1:10. Для виділення мембранної та екстрацелюлярної фракції додавали 2% тритон X-100 та 4 М сечовину відповідно до етапу центрифугування.

Оцінювання гіалуронат-зв'язуючих властивостей білків мозку проводили у трьох дослідних фракціях з різних відділів мозку за допомогою твердофазного вуглевод-ферментного аналізу (Dolzhenko et al., 1994). Результати реєстрували за допомогою спектрофотометра Anthos 2010 (Фінляндія) при 492 нм. У дослідженні застосовували глікокон'югат гіалуронової кислоти та пероксидази хрому, що синтезований у нашій лабораторії. Гіалуронат-зв'язуюча активність білків виражалася у кількості нг зв'язаного гіалуронату (ГК) на 1 мг тканини.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідним вважали результати, якщо $p < 0,05$.

Результати

Рівень гіалуронат-зв'язуючої активності водорозчинних білків у мозку дорослих щурів тримався майже на однаковому рівні та склав у гіпокампі $2,9 \pm 0,4$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, таламусі – $2,2 \pm 0,1$ нг зв'язаного (зв'яз.) ГК/мг тканини, мозочку – $2,62 \pm 0,5$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, корі великих півкуль – $2,22 \pm 0,2$ нг зв'яз. ГК/мг тканини (рис. 1).

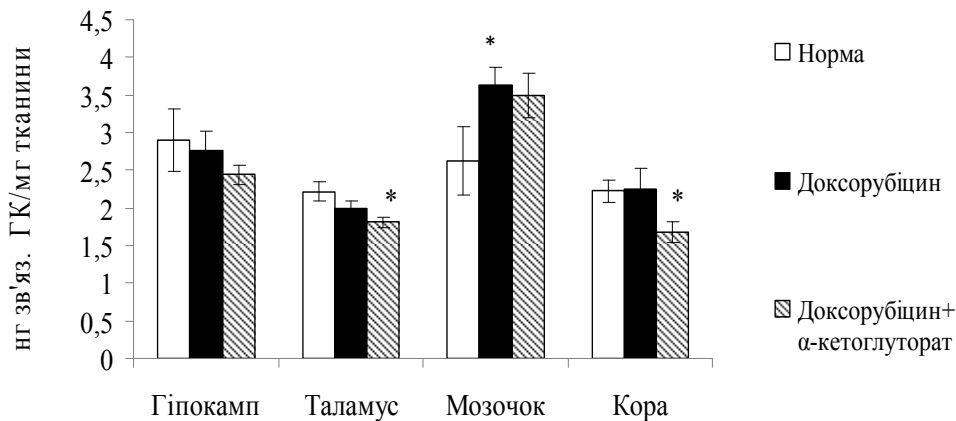


Рис. 1. Кількість зв'язування гіалуронату з водорозчинними білками мозку щурів

Примітка (тут і далі):

*Норма – щури, що отримували фізіологічний розчин внутрішньочеревно. Доксорубіцин – отримували доксорубіцин 1 мг/кг 1 раз на тиждень протягом 4 тижнів. Доксорубіцин + α-кетоглутарат – отримували ДР та 1% α-кетоглутарату з питною водою протягом 4 тижнів. n=6. * – $P \leq 0,05$.*

Застосування доксорубіцину тривалістю 4 тижні призвело до збільшення кількості зв'язування гіалуронату зі специфічними рецепторами водорозчинного компартменту тільки у мозочку на 38%, $3,63 \pm 0,2$ нг зв'яз. ГК/мг тканини.

Застосування доксорубіцину разом із 1% α-кетоглутарату протягом 4 тижнів призвело до зменшення рівня зв'язування гіалуронату зі специфічними рецепторами, визначеними в водорозчинній фракції кори великих півкуль, на 25,6%, $1,68 \pm 0,1$ нг зв. ГК/мг тканини, по відношенню до групи, що одержувала тільки доксорубіцин (рис. 1). За застосування α-кетоглутарату, не було визначено запобігання або змін гіалуронат-зв'язуючої активності у водорозчинних фракціях, що виділенні із інших дослідних відділів мозку щурів у порівнянні із значеннями групи щурів, що отримували тільки доксорубіцин.

За нормальних умов кількість зв'язування гіалуронату з мембранними білками в дослідних відділах мозку склала у гіпокампі $1,99 \pm 0,3$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, таламусі – $2,64 \pm 0,3$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, мозочку – $3,13 \pm 0,3$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, корі великих півкуль – $2,28 \pm 0,2$ нг зв'яз. ГК/мг тканини (рис. 2).

Дія доксорубіцину не призвела до суттєвих змін рівню зв'язування гіалуронату в мембранній фракції дослідних відділів мозку і залишалась у межах норми, за винятком таламусу, де було зареєстровано тенденцію до збільшення цього показника. За комплексного застосування доксорубіцину і α-кетоглутарату рівень активності гіалуронат-зв'язуючих рецепторів в мембранній фракції таламусу залишався у межах норми.

Колівання рівню гіалуронат-зв'язуючої активності екстрацелюлярних білків залежало від відділу мозку щурів з найвищим показником у таламусі (у гіпокампі $1,33 \pm 0,1$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, таламусі $5,72 \pm 0,1$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, мозочку $3,95 \pm 0,4$ нг зв'яз. ГК/мг тканини, корі великих півкуль $4,04 \pm 0,3$ нг зв'яз. ГК/мг тканини (рис. 3).

За дії доксорубіцину встановлено збільшення кількості зв'язаного гіалуронату з білками екстрацелюлярної фракції в гіпокампі на 40% та мозочку на 45%. Застосування α-кетоглутарату під час впливу доксорубіцину призвело до покращення гіалуронат-зв'язуючої активності в мозочку екстрацелюлярної фракції: а саме, сприяло зниженню активності зв'язування гіалуронової рецепторів

на 24,5% ($4,63 \pm 0,24$ нг зв. ГК / мг тканини), до рівня норми, але з великою розбіжністю значень всередині групи. За умов застосування α -кетоглутарату під час впливу доксорубіцину у гіпокампі визначено наближення гіалуронат-зв'язуючої активності екстрацелюлярних білків до рівня норми.

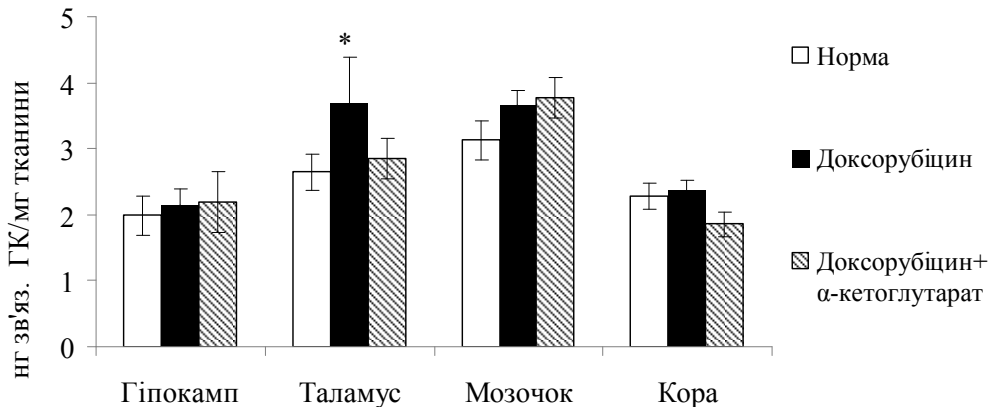


Рис. 2. Кількість зв'язування гіалуронату з мембранними білками мозку щурів
 Позначення – як у рис. 1.

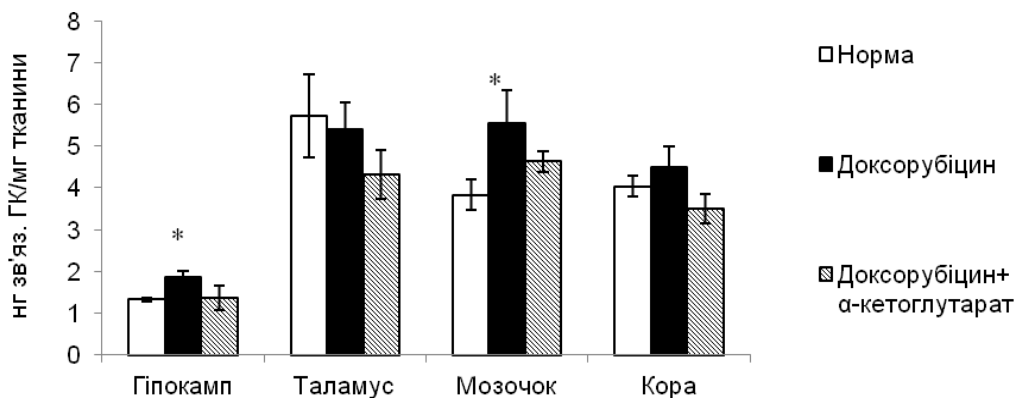


Рис. 3. Кількість зв'язування гіалуронату з екстрацелюлярними компонентами мозку щурів

Позначення – як у рис. 1.

Обговорення

Гіалуронова кислота формує вільні гідратовані матриці, які дозволяють клітинам ділитися і мігрувати, сприяти активації імунної і клітинної адгезії, а також грати важливу роль у внутрішньоклітинному сигналізованні, що забезпечується завдяки зв'язуванню гіалуронової кислоти зі специфічними білками. Гіалуронат-зв'язуючі можливості багатьох білків визначаються місцем їх розташування в клітині, тканинною експресією, специфічністю, афінністю і типом регуляції (Day, Prestwich, 2002). Тому в ході експерименту нами були виділені три субклітинні фракції мозку, до складу кожної увійшли компоненти різних частин нервових клітин. До водорозчинної фракції відносять розчинні білки цитозоля і преклітинного простору, які забезпечують сигнальну орієнтацію і взаємодію нервових клітин. Підвищення гіалуронат-зв'язуючої активності водорозчинних білків в мозочку та гіпокампі вказує на чутливість даних рецепторів (Yung, Chan, 2011) до впливу доксорубіцину. За літературними даними, накопичення гіалуронової кислоти пов'язують з дезрегуляцією синтезу гіалуронату за умов пошкодження тканин (Jiang et al., 2011). У відповідь на пошкодження активується синтез гіалуронової кислоти або активується деградація її важких ланцюгів на легкі за рахунок дії специфічних ферментів: гіалуронідази, β -глюкуронідази, β -N-ацетілглюкозамінідази, що може також збільшувати афінність специфічних рецепторів. Дезрегуляція активності гіалуронідази також

супроводжує пошкодження тканин, запалення або хвороби (Veiseh, Turley, 2011). α -Кетоглутарат самостійно може призводити до поліпшення енергетичного забезпечення біохімічних процесів у мозку, поліпшує пластичність нервової тканини, що в свою чергу сприяє більш контрольованій регуляції синтезу гіалуронової кислоти. Однак механізм такого ефекту треба детально вивчити.

Відомо, що доксорубіцин призводить до порушення координації, когнітивних порушень концентрації, уваги та ін. (Dutta, 2011; Stérba et al., 2013). Отримані дані вказують на найбільш чутливість гіалуронатних рецепторів саме у відділах мозку, що відповідають за ці процеси (мозочку, гіпокампі).

Мембранні білки забезпечують адгезію, транспорт, регуляцію процесів комунікації та ін. Саме на внутрішній стороні мембрани відбувається синтез гіалуронової кислоти гіалуронатсинтазою 1, 2 або 3 (Neilan et al., 2007). Аналіз активності гіалуронових рецепторів в мембранній фракції всіх дослідних відділів показав їх стабільність як за дії доксорубіцину у дозі 1 мг/кг ваги 1 раз тиждень протягом 4 тижнів, так і за сумісної дії доксорубіцину та α -кетоглутарату.

Підвищення рівня гіалуронат-зв'язуючої активності білків гіпокампу і мозочку, скоріше за все, супроводжується зміною специфічності зв'язування гіалуронату з лігандами екстрацелюлярного матриксу, що може впливати на міжклітинне сигналізування (Entwistle et al., 1996) в цих відділах мозку за дії доксорубіцину. Нерівномірний розподіл рівня зв'язування гіалуронату підтверджує гіпотезу, що концентрація гіалуронової кислоти збільшується саме в тих місцях, де відбувається активна міграція клітин (Yasuhaga et al., 1994), а також місцях, задіяних у механізмах відповіді мозку щурів на будь-яку токсичну дію (можливо, й доксорубіцину також).

В останніх дослідженнях було показано, що видалення гіалуронату з культури клітин гіпокампу за допомогою введення гіалуронідази призвело до розвитку еліптичної активності, що пов'язують зі змінами вмісту Ca^{2+} (Vedunova et al., 2013). Показано, що гіалуронова кислота може регулювати синаптичні функції в гіпокампі і, коли відбувається аномальне накопичення гіалуронової кислоти, ці основні функції гальмуються, що викликає патологічні зміни, характерні для загальних неврологічних захворювань (Kochlamazashvili et al., 2010). Але за таких розладів гіалуронат-зв'язуюча активність збільшується в рази. В нашому дослідженні виявлені несуттєві коливання афінності гіалуронат-зв'язуючих рецепторів, що, скоріше за все, обумовлено підтримкою нейрональної пластичності нервової системи у відповідь на опосередковану дію доксорубіцину, оскільки сам доксорубіцин не проходить гематоенцефалічний бар'єр.

Висновки

Отримані дані показали специфічність афінності білків до гіалуронату залежно від відділу мозку щурів та субклітинного компартменту. Дія доксорубіцину 1 мг/кг 1 раз на тиждень протягом 4 тижнів суттєво не впливає на даний параметр у мозку щурів, а має адаптивний характер. Застосування α -кетоглутарату на фоні дії доксорубіцину сприяє більш стабільному статусу гіалуронат-зв'язуючих компонентів у мозку щурів.

Список літератури

- Бакланова Я.В., Ушакова Г.О. Токсичні ефекти та біохімічний контроль наслідків антрациклінової терапії // Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2013. – Т.22, №1. – С. 242–248. /Baklanova Ya.V., Ushakova G.A. Toksychni efekty ta biochimichnyy control' naslidkiv antratsyklinovoi terapii // Arkhiv klinichnoi ta eksperymental'noi medytsyny. – 2013. – Т.22, №1. – С. 242–248./
- Ananthanarayanan B., Kim Y., Kumar S. Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform // Biomaterials. – 2011. – Vol.32 (31). – P. 7913–7923.
- Dakshayani K.B., Subramanian P. Alpha-ketoglutarate modulates the circadian patterns of lipid peroxidation and antioxidant status during N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats // J. Med. Food. – 2006. – Vol.9. – P. 90–97.
- Day A.J., Prestwich G.D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol.277 (7). – P. 4585–4588.
- Dolzhenko M.I., Lepekhin E.A., Berezin V.A. A novel methods for evaluation of carbohydrate-binding activity: enzyme-linked carbohydrate-binding assay (ELCBA) // International Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 1994. – Vol.34 (2). – P. 261–271.
- Dutta V. Chemotherapy, neurotoxicity, and cognitive changes in breast cancer // Journal of Cancer Research and Therapeutics. – 2011. – Vol.7 (3). – P. 264–269.

- Entwistle J., Hall C.L., Turley E.A. HA receptors: regulators of signaling to the cytoskeleton // *J. Cell. Biochem.* – 1996. – Vol.61 (4). – P. 569–577.
- Guptaa D., Tatorc C.H., Shoicheta M.S. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord // *Biomaterials.* – 2006. – Vol.27 (11). – P. 2370–2379.
- Harrison A.P., Pierzynowski S.G. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art – review article // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol.59. – P. 91–106.
- Itano N., Atsumi F., Sawai T. et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol.19 (6). – P. 3609–3614.
- Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases // *Physiol. Rev.* – 2011. – Vol.91 (1). – P. 221–264.
- Kochlamazashvili G., Henneberger C., Bukalo O. et al. The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic I-type Ca^{2+} channels // *Neuron.* – 2010. – Vol.15 (67). – P. 116–128.
- Kovalenko T.N., Ushakova G.A., Osadchenko I. et al. The neuroprotective effect of 2-oxoglutarate in the experimental ischemia of hippocampus // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol.62 (2). – P. 239–246.
- Mellor L., Knudson C.B., Hida D. et al. Intracellular domain fragment of CD44 alters CD44 function in chondrocytes // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol.6 (36). – P. 25838–25850.
- Moore H.C. An overview of chemotherapy-related cognitive dysfunction, or 'chemobrain' // *Oncology (Williston Park)* – 2014. – Vol.28 (9). – P. 797–804.
- Neilan T.G., Blake S.L., Ichinose F. et al. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin // *Circulation.* – 2007. – Vol.116. – P. 506–514.
- Rowlands D., Sugahara K., Kwok J.C. Glycosaminoglycans and glycomimetics in the central nervous System // *Molecules.* – 2015. – Vol.20 (3). – P. 3527–3548.
- Stěrba M., Popelová O., Vávrová A. et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol.10 (8). – P. 899–929.
- Tulsawani R., Bhattacharya R. Effect of alpha-ketoglutarate on cyanide-induced biochemical alterations in rat brain and liver // *Biomed. Environ. Sci.* – 2006. – Vol.19. – P. 61–66.
- Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E. et al. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – Vol.7. – P. 149–161.
- Veiseh M., Turley E.A. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer // *Integr. Biol.* – 2011. – Vol.3. – P. 304–315.
- Xie Y., Upton Z., Richards S. et al. Hyaluronic acid: evaluation as a potential delivery vehicle for vitronectin: growth factor complexes in wound healing applications // *Journal of Controlled Release.* – 2011. – Vol.153 (3). – P. 225–240.
- Yadav A.K., Mishra P., Mishra A.K. et al. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin // *Nanomedicine.* – 2007. – Vol.3 (4). – P. 246–257.
- Yung S., Chan T.M. Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan // *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2011. – Vol.2011. – P. 1–11.
- Yasuhara O., Akiyama H., McGeer E.G. et al. Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain // *Brain Res.* – 1994. – Vol.28. – P. 269–282.

Представлено: О.З.Бразалук / Presented by: O.Z.Brazaluk

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 06.05.2015