

*Henryk Lach**, *Maria J. Korohoda***,
*Karol Dziubek**, *Józef Ryczek**

Zawartość glutationu (GSH) w wybranych narządach myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego

Streszczenie

Analizowano zawartość GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach u samców myszy po podaniu pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego. Poziom GSH oznaczano metodą Ellmana.

Wykazano w większości przypadków spadek zawartości GSH w badanych narządach zarówno po iniekcjach 30 mg/kg, jak i 60 mg/kg wagi ciała. Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że podawane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego nie są induktorami syntezy GSH.

Wstęp

Glutation zredukowany (GSH) jest powszechnie obecny w tkankach i narządach organizmów zwierzęcych. Odgrywa bardzo ważną rolę, m.in. w usuwaniu nadtlenków wodoru i nadtlenków lipidów z komórek aerobów. Jako substrat peroksydazy glutationowej kontroluje tempo utleniania lipidów poprzez hamowanie ich degradacji

*Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie

**Samodzielny Zakład Chemii, jw.

do aldehydów i innych toksycznych metabolitów (Riley 1984). Ma więc swój udział w mechanizmach kontrolujących tempo peroksydacji lipidów obok wolnych jonów metali nie katalizujących proces utleniania, np. jonów żelaza (Crichton 1979), lub witaminy E (Packer i inni 1979).

GSH uczestniczy także w odtwarzaniu kwasu askorbinowego (Basu i inni 1979), oraz w metabolizmie pestycydów, herbicydów i leków (Jacoby i Keen 1977, Huston i inni 1984). Ponadto jest koenzymem wielu enzymów, różnych metabolicznych dróg, np. glioksalazy, izomera, biosyntezy białka czy enzymów utrzymujących integralność błon cytoplazmatycznych (Kosower i Kosower 1972), oraz uczestniczących w metabolizmie substancji energetycznych, głównie węglowodanów (Meister 1984).

Wahania w koncentracji GSH odzwierciedlają ogólny stopień zaburzeń metabolicznych organizmu. Dlatego między innymi w naszych poprzednich badaniach (Dziubek, Korohoda, Ryczek 1994) określono zawartość GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach myszy po podaniu nowych 5-benzylidenowych pochodnych kwasu 2-tiohydantoino-3-octowego. Spośród testowanych pochodnych 2'-metylobenzylideno-2-tiohydantoino-3-octan potasu wywołał istotny wzrost zawartości GSH w krwi i wszystkich badanych narządach. Natomiast przedmiotem niniejszej pracy jest określenie zawartości GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach myszy pod wpływem izologicznych 5-benzylidenowych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego. Ponieważ obie grupy związków różnią się tylko jakością atomu tlenowca w pozycji 2 pierścienia hydantoinowego, uzyskane wyniki pozwolą na porównanie, jak zmiana atomu siarki na tlen wpływa na poziom GSH, a tym samym na wyciągnięcie wstępnych wniosków dotyczących zależności między strukturą badanych związków, a ich działaniem w tym kierunku.

Materiał i metodyka badań

A. Synteza nowych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego oraz określenie ich struktury

Do badań biologicznych wykorzystano cztery nowe kwasy 5-benzylideno-hydantoino-3-octowe, tj.: kwas 2'-metylobenzylideno-hydan-

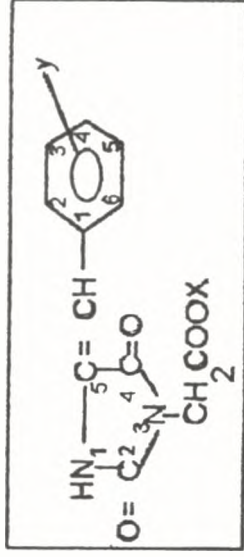
toino-3-octowy HA-1, kwas 3'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octowy HA-2, kwas 4'-metylobenzylideno-3-octowy HA-3 oraz kwas 4-dimetylobenzylideno-hydantoino-3-octowy H-4.

Związki te otrzymano przez odsiarkowanie odpowiednich pochodnych kwasów 5-benzylideno-2-tiohydantoino-3-octowych, których syntezę opisano w pracy: Dziubek, Korohoda i Ryczek (1994). Odsiarkowanie przeprowadzono kwasem monochlorooctowym (Korohoda 1981). Ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie związków HA-1, HA-2 i HA-3 przeprowadzono je w odpowiednie sole potasowe, otrzymując: 2-metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu PHA-1, 3'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu PHA-2 i 4'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu PHA-3. Związek HA-4 charakteryzował się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, co sugeruje możliwość tworzenia soli wewnętrznej. Dane fizykochemiczne dotyczące otrzymanych związków są zestawione w tabeli 1. Strukturę związków potwierdzono analizą elementarną i badaniami spektralnymi (IR, HNMR).

Widma IR. W widmach wszystkich badanych związków występuje pasmo drgań rozciągających grupy NH w zakresie 3200–3320 cm^{-1} oraz pasmo $\nu\text{C}=\text{C}$ w zakresie 1640–1650 cm^{-1} . Ponadto występują dwa pasma drgań $\nu\text{C}=\text{O}$ w zakresach 1700–1720 cm^{-1} i 1750–1770 cm^{-1} charakterystyczne dla grup karbonylowych w pozycjach 2 i 4 pierścienia hydantoinowego (tab. 1).

Widma¹ HNMR. Wartości przesunięć chemicznych σ protonów występujących w cząsteczkach badanych związków zestawiono w tabeli 2. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku pochodnych kwasów 5-benzylideno-2-tiohydantoino-3-octowych (Dziubek, Korohoda, Ryczek 1994) w żadnych z badanych związków nie udało się ustalić położenia sygnału pochodzącego od protonu grupy COOH, a w solach potasowych od protonu NH. Celem potwierdzenia przesunięcia chemicznego protonu grupy NH w kwasach związku HA-2 i HA-3 poddano deuterowaniu śladowymi ilościami NaOD w D_2O . Porównanie przesunięć chemicznych protonów grupy NH w kwasach 2-tiohydantoino-3-octowych (Dziubek, Korohoda, Ryczek 1994) i kwasach hydantoino-3-octowych HA-1 – HA-4 pozwala stwierdzić, że wymiana siarki na tlen w pozycji C-2 pierścienia powoduje znaczne

Tab. 1. Dane pochodnych kwasów hydantoino-3-octowych oraz ich soli potasowych



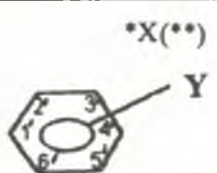
Symbol związku	X	Y	Wzór sumaryczny	Wyd. %	T.t. °C*	Analiza						IR, cm ⁻¹ **						
						Obliczono %			Otrzymano %			γ NH	γ C=O	γ C=C				
						C	H	N	C	H	N							
HA-1	H	2'-CH ₃		80,0	260-261													
HA-2	H	3'-CH ₃	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ (260)	78,4	270-271	56,5	4,1	10,1	56,4	4,5	10,1	3300	1770	1710	1650			
HA-3	H	4'-CH ₃		94,4	278-279				56,5	4,4	10,1	3240	1770	1720	1650			
HA-4	H	3'-N(CH ₃) ₂	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₄ (289)	53,0	288-300	55,1	4,1	13,8	57,9	5,3	14,2	3200	1760	1700	1640			
PHA-1	K	2'-CH ₃		90,0	329-331				52,3	3,6	9,2	3280	1750	1700	1650			
PHA-2	K	3'-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ (298)	83,3	319-321	52,4	3,7	9,4	52,4	3,7	9,1	3320	1750	1710	1650			
PHA-3	K	4'-CH ₃		76,6	340-343				52,1	3,7	9,3	3320	1770	1710	1650			

*Oznaczono w aparacie Boettiusa

**Wykonano na spektrofotometrze IR-75(Zeiss) w zakresie 400-3800 cm⁻¹ w HCB

(ok. 2ppm) przesunięcie sygnału w kierunku pola o wyższym natężeniu. W przypadku pozostałych protonów wpływ ten jest również zauważalny, ale znacznie słabszy. Uzyskane dane są zgodne z wcześniejszymi wynikami dla innych pochodnych hydantoiny i 2-tiohydantoiny (Korohoda, 1983).

Tab. 2. Widma¹ HNMR* pochodnych kwasów hydantoino-3-octowych oraz ich soli potasowych

Symbol związku	Przesunięcie chemiczne δ , ppm				
	CH ₃	CH ₂	=CH		NH
HA-1	2,35s	4,22s	6,67s	7,76–7,05 m	10,83
HA-2	2,35s	4,22s	6,56s	7,69–7,01 m	10,93
HA-3	2,34s	4,22s	6,58s	7,25d i 7,56 d	10,87
HA-4	2,98s	4,19s	6,53s	6,75d i 7,51 d	10,66
PHA-1	2,34s	3,82s	6,57s	7,73–7,09 m	–
PHA-2	2,34s	3,69s	6,42s	7,69–6,98 m	–
PHA-3	2,33s	3,70s	6,43s	7,23d–7,53 m	–

Wykonano na spektrofotometrze FT NMR (80 KHz) BS % &A (Tesla) w DMSO-d₆ w odniesieniu do TMS jako wzorca wewnętrznego w temperaturze pokojowej.

Skróty s-singlet, d-dublet, m-multiplet

B. Przygotowanie materiału i oznaczenie glutationu

Badania przeprowadzono na 80 samcach myszy białej, dojrzałych płciowo, o średniej wadze 25 g, które żywiono pokarmem standardowym i hodowano w warunkach oświetlenia LD 12:12. Zwierzęta przeznaczone do badań podzielono na dwie grupy kontrolne i 8 grup doświadczalnych.

Zwierzętom grup doświadczalnych podawano zsyntetyzowane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego: PHA-1, PHA-2, PHA3 i HA-4. W pierwszych czterech grupach doświadczalnych zwierzętom podawano powyższe pochodne w dawce 30 mg/kg wagi ciała przez okres dwóch

dni (dwie iniekcje), zaś w pozostałych grupach eksperymentalnych – w dawce 60 mg/kg wagi ciała również przez okres dwóch dni.

W grupach doświadczalnych zwierzęta zabijano w następnym dniu od ostatniej iniekcji.

Po dekapitacji oznaczano zawartość GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach według metodyki podanej przez Ellmana (1959). Z uzyskanych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Dla stwierdzenia, czy uzyskane zmiany zawartości GSH pomiędzy kontrolą, a poszczególnymi grupami badawczymi są statystycznie istotne zastosowano test „t” Studenta-Gosseta.

Wyniki

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tabelach 3 i 4 oraz zilustrowano na ryc. 1–4

Tab. 3. Zmiany zawartości glutationu w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach u samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-ocowego w dawce 30 mg/kg

Grupa badawcza	Badany narząd			
	Krew	Mózg	Wątroba	Nerki
Kontrola	1,9080	0,7562	2,1758	1,5872
SD	0,2767	0,1337	0,4088	0,2136
PHA-1	2,0285	0,7728	2,1562	0,9748
SD	0,3165	0,2257	0,2952	0,2019
„t”	0,6801	0,1621	0,0845	4,7570*
PHA-2	1,7295	1,2055	1,9450	1,5747
SD	0,2708	0,2883	0,8006	0,2979
„t”	1,0594	3,7911	0,6775	0,0845
PHA-3	1,6457	0,3950	1,1050	0,3962
SD	0,1909	0,0488	0,3525	0,0436
„t”	1,6858	5,1279*	4,9341*	10,7848*
HA-4	1,7783	0,3942	1,2545	0,5460
SD	0,1469	0,2157	0,2294	0,3436
„t”	2,6704	3,6325	4,1281*	6,5497*

*-statystycznie istotne przy $P < 0,01$. Zawartość glutationu w krwi wyrażano w mM/l, zaś w mózgu, wątrobie i nerkach w $\mu\text{M/g}$

Tab. 4. Zmiany zawartości glutationu w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach u samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego w dawce 60 mg/kg

Grupa badawcza	Badany narząd			
	Krew	Mózg	Wątroba	Nerki
Kontrola	1,9080	0,7562	2,1758	1,5872
SD	0,2767	0,1337	0,4088	0,2136
PHA-1	1,5130	0,7422	2,5805	1,0638
SD	0,3612	0,1519	0,4006	0,1739
„t”	2,1172	0,1638	1,6260	4,2179*
PHA-2	1,5314	1,0537	2,0757	1,6816
SD	0,3965	0,2148	0,1711	0,2636
„t”	1,9367	1,0872	0,4609	0,6710
PHA-3	1,3512	0,3950	1,5375	0,4637
SD	0,3296	0,0509	0,2657	0,1134
„t”	3,0959	5,1153*	4,4895*	9,6949*
HA-4	1,6982	0,3514	1,5392	0,4257
SD	0,2475	0,1575	0,5516	0,1655
„t”	0,5566	4,6761*	2,2778	9,4629*

*-statystycznie istotne przy $P < 0,01$. Zawartość glutationu w krwi wyrażano w mM/l, zaś w mózgu, wątrobie i nerkach w $\mu\text{M/g}$

Krew

Podanie zsyntetyzowanych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4 spowodowało obniżenie zawartości GSH w obydwóch grupach doświadczalnych, z wyjątkiem PHA-1 w drugiej grupie eksperymentalnej, gdzie zanotowano wzrost zawartości GSH w stosunku do grupy kontrolnej.

Mózg

Po podaniu PHA-1 nie zanotowano wyraźnych zmian w zawartości GSH w obydwóch grupach doświadczalnych. PHA-2 wywołała wzrost zawartości GSH tylko w pierwszej grupie doświadczalnej, natomiast PHA-3 i HA-4 spowodowały spadek zawartości GSH w pierwszej i drugiej grupie eksperymentalnej.

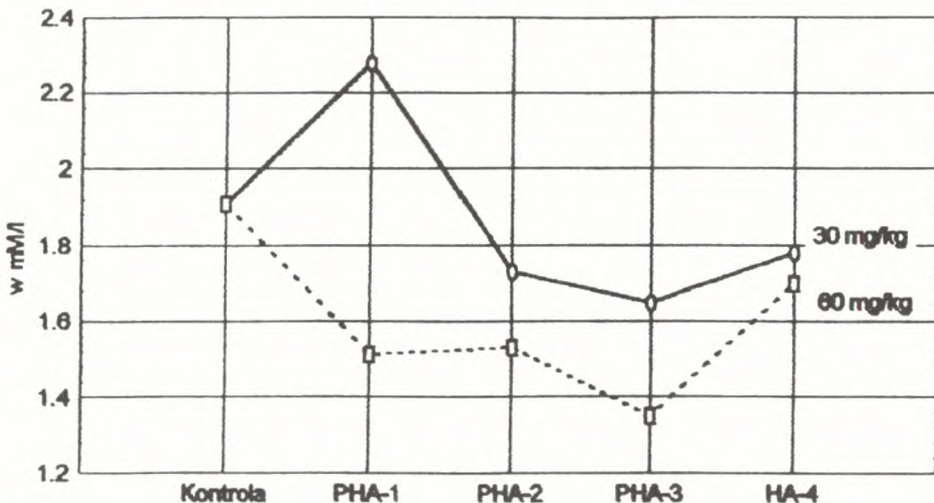
Wątroba

Podanie PHA-1 i PHA-2 nie wywołało zmian w zawartości GSH w obydwóch grupach doświadczalnych, natomiast podanie HA-4 spowodowało obniżenie zawartości GSH w pierwszej grupie doświadczalnej, a PHA-3 w obydwóch grupach badawczych.

Nerki

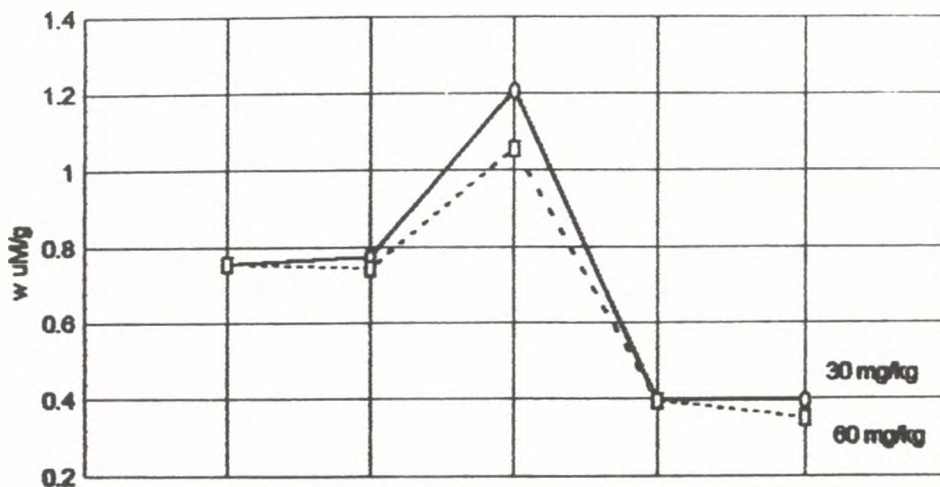
PHA-1 wywołała spadek zawartości GSH w obydwóch grupach eksperymentalnych, w przeciwieństwie do PHA-2, która nie spowodowała większych zmian w porównaniu z grupą kontrolną. PHA-3 i HA-4 zdecydowanie obniżyły zawartość GSH w obydwóch grupach doświadczalnych.

ZMIANY ZAWARTOŚCI GSH W KRWI
po podaniu pochodnych hydantoiny



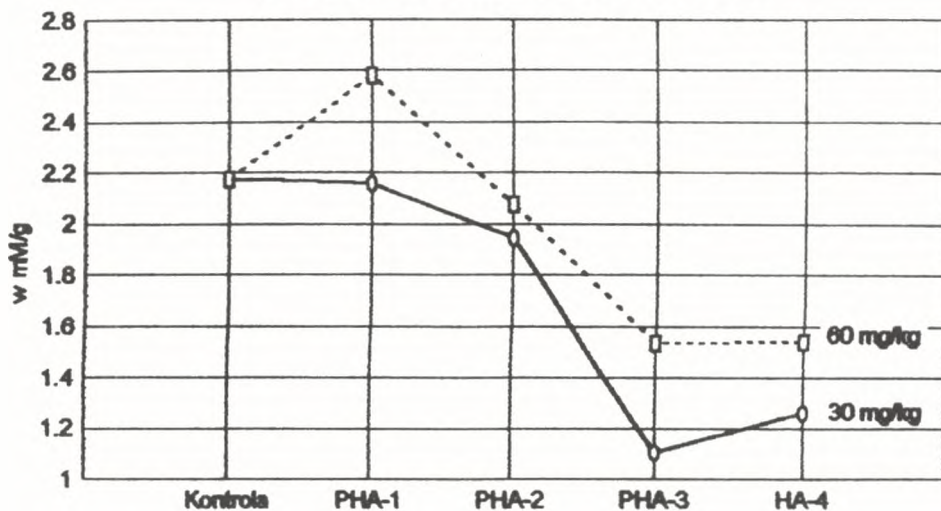
Ryc. 1. Zmiany zawartości GSH w krwi samców myszy pod wpływem 2'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octanu potasu PHA-1, 3'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octanu potasu PHA-2, 4'-metylobenzylideno-hydantoino-3-octanu potasu PHA-3 i kwasu 4'-demetylobenzylideno-hydantoino-3-octowego HA-4

ZMIANY ZAWARTOŚCI GSH W MÓZGU po podaniu pochodnych hydantoiny



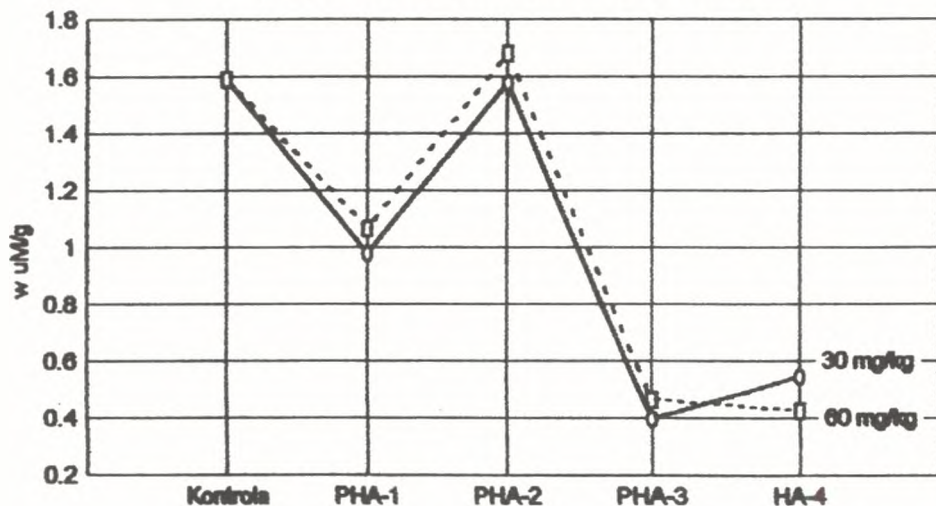
Ryc. 2. Zmiany zawartości GSH w mózgu samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-ocowego PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4

ZMIANY ZAWARTOŚCI GSH W WĄTROBIE po podaniu pochodnych hydantoiny



Ryc. 3. Zmiany zawartości GSH w wątrobie samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-ocowego PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4

ZMIANY ZAWARTOŚCI GSH W NERKACH po podaniu pochodnych hydantoiny



Ryc. 4. Zmiany zawartości GSH w nerkach samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4

Dyskusja

Podane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego generalnie nie zmieniały, względnie spowodowały spadek zawartości GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach, z wyjątkiem krwi w przypadku podania PHA-1 w drugiej grupie doświadczalnej i mózgu w pierwszej grupie doświadczalnej po podaniu PHA-2.

W lecznictwie znajdują zastosowanie liczne pochodne hydantoiny, głównie zawierające podstawniki w położeniu 5. Musiał, Korohoda (1966); Korohoda, Kleinrok, Przegaliński (1976); Tobiasz-Otrębska, Musiał, Czarnecki, Krupińska (1976) badając aktywność wielu benzylidynowych po-

chodnych 2-tiohydantoiny stwierdzili, że po podstawieniu do grupy benzyliденowej rodników metylowych podnosi się ich aktywność przeciwdrgawkową. Dlatego w serii poprzednio badanych pochodnych kwasu 2-tiohydantoino-3-octowego (Dziubek, Korohoda, Ryczek 1994) i obecnie opisywanych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego wprowadzono do grupy benzyliденowej podstawniki metylowe. Spośród przebadanych pochodnych kwasu 2-tiohydantoino-3-octowego jedynie 2'-metylobenzylidyno-2-tiohydantoino-3-octan potasu wywołał wzrost zawartości GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach myszy, natomiast inne testowane pochodne 2-tiohydantoinowe powodowały wzrost zawartości GSH wybiórczo. W odróżnieniu od tych wyników, po podaniu izologicznych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego nastąpił spadek zawartości GSH w badanych tkankach, przy czym w niewielu przypadkach obserwowana zawartość GSH nie różniła się od wartości kontrolnych.

Z punktu widzenia formakologii i toksykologii zmiany stężenia GSH w komórkach odgrywają bardzo istotną rolę. W przypadku niektórych chorób, głównie nowotworowych, np. raka krtani (Drożdż i inni 1988, Clapper 1989) obserwuje się obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej i zmniejszenie zawartości GSH w chorym narządzie. Podobnie w niedożywieniu i symulowanych operacjach (stres), a także w infekcjach szczurów obserwowano spadek zawartości GSH, głównie w wątrobie (Lescut i inni 1991). Green i inni (1984) stwierdzili, że obniżenie zawartości GSH powoduje wyraźny wzrost cytotoksyczności leków, zwłaszcza antynowotworowych.

Podane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego ze względu na fakt, że obniżają zawartość GSH w badanych tkankach, pomimo przypuszczalnych właściwości antydepresyjnych, wydają się – w myśl powyższych danych – terapeutycznie niedoskonałymi.

Izologiczne pochodne kwasu 2-tiohydantoino-3-octowego charakteryzują się przeciwnym działaniem, indukując w większości syntezę GSH (Dziubek, Korohoda, Ryczek 1994), co sugeruje, że w tego typu związkach zamiana siarki na tlen w pozycji 2 pierścienia hydantoinowego jest przyczyną istotnych różnic w zawartości GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach badanych myszy.

Literatura

- Basu S., Som S., Deb S., Mukherjee D., Chatterje I.B., 1979, *Dehydro-ascorbic acid reduction in human erythrocytes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1335–1340
- Clapper Margie L., Tew Kenneth D., 1989, *Identification of a-glutathione S-transferase associated with microsomes of tumor cells resistant to nitrogen mustards*. Biochem. Pharmacol. 38, No 12-C: 1915–1921
- Crichton R.R., 1979, *Interaction between iron metabolism and oxygen activation. In Oxygen free radicals and tissue damage*. Ciba Foundation Symposium, 65: 57–76. Elsevier, Amsterdam
- Drożdż M. Gierek T., Piekarska J., Pilch J., 1988, *Decreased activity of glutathione content in cancer of the Larynx* Rev. Roum Biochem. 25, No 4: 329–332
- Dziubek K., Korohoda J.M., Ryzek J., 1994, *Effect of derivatives of 2-thiohydantoin-3-acetic acid in glutathione (GSH) content in selected organs of mice*. Crac. Ser. Zool. (in press) 36: 1–12.
- Ellman G.L., 1959, *Tissue sulfhydryl groups*. Arch. Biochem. Biophys., 82: 70–77
- Green J.A., Vistica D.T., Youna R.G., Hamilton T.C., Rogan A.M., Ozds R.F., 1984, *Potential of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion*. Cancer Res., 44: 5427–5431
- Hutson D.H., Lakeman S.K., Logan C.J., 1984, *The fate of 4-cyano-N, N-dimethylaniline in rats: metabolism of anilines*. Xenobiotica. 12: 925–934
- Jacoby W.B., Keen J.H., 1977, *A triple threat in detoxification. The glutathione-S-transferases*. Trends Biochem. Sci. October issue: 229–231
- Korohoda M.J., Kleinrok Z., Przegaliński E., 1976, *A search for new anticonvulsant compounds among 3-aryl-5-benzylidene derivatives of 2-thiohydantoin*. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 28: 329–333
- Korohoda M.J., 1981, *Introduction of selenium to heterocyclic compounds. Part II. Synthesis of 3-alkyl-2-selenohydantoins 2-selenohydantoin-3-acetic acids and 2-selenorhodanines with double bond at C-5*. Polish J. Chem., 55: 359–369
- Korohoda M.J.: 1983, *Application of proton magnetic resonance (PMR) for an identification of hydantoins, 2-thiohydantoins and 2-seleno-hydantoins*. Chemia Analit., 28: 157–160
- Kosower N.S., Kosower E.M., 1978, *The glutathione status of cells*. Int. Rev. Cytol., 54: 109–160
- Lescut D., Fouin-Fortuned H., Moore N., Petit J., Hecketsweiler B., Lemeland J.F., Denis P., Collin R., 1991, *Liver glutathione and cytochrome P-450 activity in experimental infection: study of the relative effects of infection stress and malnutrition*. Crit. Care. Med. 19(9): 1183–1187
- Meister A., 1984, *New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy*. Hepatology., 4: 739–742

- Musiał L., Korohoda M.J., 1966, *Synteza nowych związków potencjalnie antykonwulsyjnych z grupy pochodnych 2-tiohydantoiny podstawionych w położeniach 3 i 5*. I. Roczniki Chem., 40: 997–1004
- Packer J.E., Slater T.F., Willson R.L., 1979, *Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C*. Nature (Lond.), 278: 737–738
- Riley M.V. 1984, *A role for glutathione and glutathione reductase in control of corneal hydration*. Exp. Eye Res., 39: 751–758.
- Tobiasz-Otrębska K., Musiał L., Czarnecki R., Krupińska I., 1976, *New anticonvulsive drugs 3-o-nitro-5-benzylidene derivatives of 2-thiohydantoin*. Acta Pharm. Jugosl., 26: 61–66

Henryk Lach, Maria J. Korohoda, Karol Dziubek, Józef Ryczek

The Concentration of Glutathione (GSH) in Selected Organs of Mice after the Effect of Derivatives of Hydantoin-3-Acetic Acid

Summary

Analyse the concentration of GSH in the blood, brain, liver and kidneys after the effect of some derivatives of hydantoin-3-acetic acid.

Obtained in most case decreased of concentration of GSH in the examined organs, of doses 30 and 60 mg/kg body weight. The results obtained suggest that the administrated derivatives hydantoin-3-acetic acid are not inductors of the synthesis of GSH.