

УДК 615.739.6:616.61-08

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ОКСИДАТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧЕК КРЫС В УСЛОВИЯХ ДОКСОРУБИЦИНОВОЙ НЕФРОПАТИИ

С.М. Напалкова, О.С. Селиванова

Ульяновский государственный университет

Изучено влияние глицина на функциональные и окислительные показатели почек крыс в условиях доксорубициновой нефропатии. Определены концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови, общего белка в моче, содержание восстановленного глутатиона, белковых карбонильных групп и малонового диальдегида в почечном гомогенате, а также активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Выявлено, что глицин предупреждает доксорубицин-индуцированное нарушение функциональной активности и развитие оксидативного стресса в почках крыс.

ВВЕДЕНИЕ

Доксорубицин относится к группе противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда и является одним из самых востребованных цитостатиков в лечении гемобластозов и солидных злокачественных опухолей [1, 2]. Однако возможности химиотерапии злокачественных опухолей с его использованием ограничиваются системными токсическими эффектами препарата, как в отношении сердца [3, 4], так и почек [5, 6]. Следует отметить, что большинство исследований токсичности доксорубицина было посвящено изучению кардио-, а не нефротоксичности данного препарата. Хотя еще неизвестно, кардиотоксичность ли предшествует нефротоксичности или наоборот, она является следствием поражения почек [7].

Несмотря на широкое применение в клинике, механизм действия антрациклиновых антибиотиков до настоящего времени остается спорным. Большинство ученых считают, что противоопухолевый эффект доксорубицина реализуется преимущественно через ингибирование ферментов репликации ДНК. В результате встраивания препарата в спираль ДНК блокируется активность ДНК-топоизомеразы, что нарушает клеточный цикл и запускает механизм апоптоза [8]. Для токсического действия в отношении нормальных тканей наибольшее значение имеет образование свободных радикалов кислорода [9] в результате редокс-циклических реакций [10, 11] и влияния доксорубицина на обмен железа [12, 13]. Различия в механизмах противоопухолевого и токсического дей-

ствия антрациклинов создают принципиальные предпосылки, что можно снизить их токсические влияния путем применения веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, без ущерба для противоопухолевого эффекта [14].

В последние годы установлено, что глицин предупреждает развитие оксидативного стресса в слизистой оболочке желудка при этаноловом повреждении [15], в печени при действии пяти гепатотоксикантов – бутанола, $CdCl_2$, $CuCl_2$, Na_3PO_4 и бутилгидропероксида [16], а также в печени и почках крыс при хронической кадмиевой интоксикации [17].

Целью работы явилось исследование влияния глицина на функциональные и окислительные показатели почек крыс в условиях доксорубициновой нефропатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 35 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах весом 240-290 г. Животные были разделены на пять равных групп (таблица 1).

Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводились под общим наркозом (этамил-натрий из расчета 50 мг/кг внутривенно). Животные умерщвлялись путем декапитации. При этом производился забор крови путем пункции сердца для исследования концентрации креатинина и мочевины (коммерческий набор фирмы «Ольвекс», г. Москва). Моча забиралась из мочевого пузыря для определения концентрации общего белка [18].

Немедленно после забора биологических жидкостей удалялась левая почка для изучения показа-

Схема проведения эксперимента

п/п	Условия эксперимента	Количество животных
1.	<i>Интактные животные</i>	n=7
2.	<i>Контрольные животные (0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида однократно внутривнутрибрюшинно)</i>	n=7
3.	<i>Доксорубицин (7,5 мг/кг/сутки однократно внутривнутрибрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида)</i>	n=7
4.	<i>Глицин (50 мг/кг/сутки однократно внутривнутрибрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида) за 30 минут до инъекции доксорубицина</i>	n=7
5.	<i>Глицин (50 мг/кг/сутки однократно внутривнутрибрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида)</i>	n=7

телей перекисного окисления липидов (концентрации малонового диальдегида [19], белковых карбонильных групп [20] и восстановленного глутатиона [21]) и состояния антиоксидантной системы (активность глутатионредуктазы [22], глутатионпероксидазы [23] и супероксиддисмутазы [24]).

Все полученные результаты исследования были подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Unistat Statistical Package 5.001. Оценку достоверности различий проводили по « χ^2 » и t-критерию Стьюдента. Статистически достоверными различия между группами признавались при 95% уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе контрольных животных, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия, не наблюдалось достоверных изменений изучаемых показателей по сравнению с животными интактной группы.

Введение доксорубицина привело к поражению почек, которое характеризовалось 17-тикратным повышением общего белка в моче (с $5,11 \pm 1,48$ до $92,82 \pm 11,77$ мг/мл, $p < 0,001$) и 40%-ным увеличением концентрации мочевины в сыворотке крови (с $18,97 \pm 0,41$ до $26,58 \pm 0,37$ мг/100 мл, $p < 0,001$) по сравнению с контрольными животными. Док-

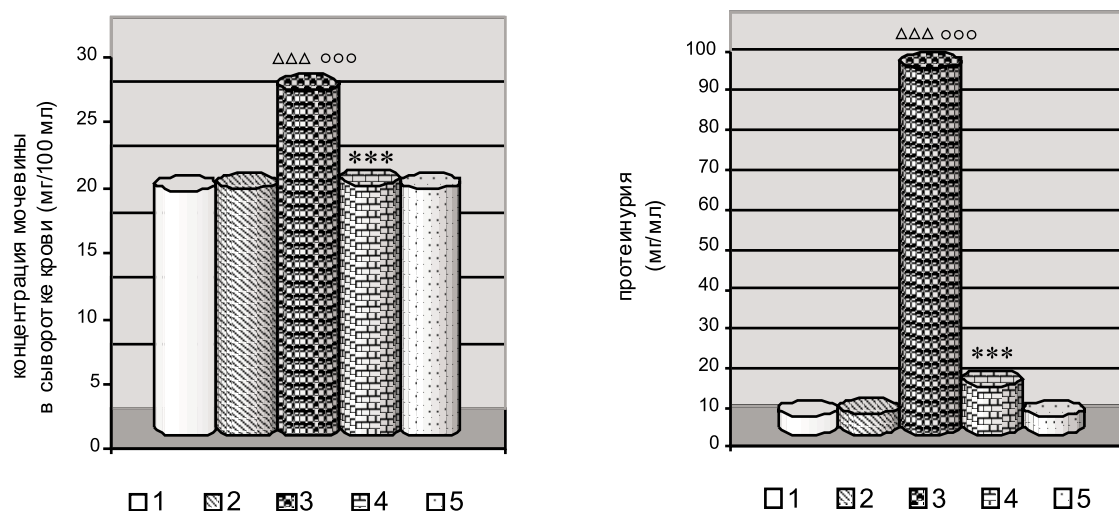


Рис. 1. Изменение концентрации мочевины в сыворотке крови и общего белка в моче животных под влиянием исследуемых препаратов: 1 – интактные животные, 2 – контроль, 3 – доксорубицин, 4 – глицин + доксорубицин, 5 – глицин

Примечание: статистически достоверно по сравнению: $\Delta\Delta\Delta$ – с интактной группой при $p < 0,001$; $\circ\circ\circ$ – с контрольной группой при $p < 0,001$; $***$ – с группой животных, получавших только доксорубицин при $p < 0,001$.

Влияние исследуемых препаратов на содержание показателей оксидативного стресса и активность антиоксидантных ферментов в почках у крыс

Группа	Интактные	Контроль	Доксорубицин	Глицин + доксорубицин	Глицин
Белковые карбонильные группы (моль/мг белка)	2,02±0,12	2,06±0,18	2,64±0,16 ^{Δ°}	2,19±0,08	2,04±0,12
Малоновый диальдегид (нмоль/мг белка)	1,92±0,07	1,90±0,05	2,17±0,06 ^{ΔΔ°}	1,93±0,06 *	1,88±0,10
Восстановленный глутатион (мкг/мг белка)	2,73±0,05	2,75±0,08	2,34±0,08 ^{ΔΔ°}	2,71±0,06 **	2,76±0,09
Глутатионпероксидаза (мкмоль/ мин/мг белка)	1,96±0,08	1,93±0,13	1,44±0,06 ^{Δ°}	1,86±0,08***	1,93±0,14
Глутатионредуктаза (нмоль/мин/мг белка)	5,39±0,13	5,39±0,18	4,29±0,11 ^{Δ°}	5,14±0,08 ***	5,41±0,13

Примечание: статистически достоверно по сравнению с интактной группой ^Δ – при $p < 0,05$ и ^{ΔΔ} – при $p < 0,01$; с контрольной группой [°] – при $p < 0,05$ и ^{°°} – при $p < 0,01$; с группой животных, получавших только доксорубицин * – при $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ и *** – при $p < 0,001$.

сорубицин-индуцированное повышение концентрации мочевины в сыворотке крови было нивелировано введением глицина за 30 минут до инъекции антрациклинового антибиотика (19,25±0,53 мг/100 мл, $p < 0,001$). Вызванную протеинурию полностью предупредить не удалось, но выраженность ее уменьшилась в 8 раз под действием глицина (12,41±3,16 мг/мл, $p < 0,001$). Глицин, применяемый без доксорубицина, не вызвал достоверных изменений изучаемых показателей по сравнению с группами интактных и контрольных животных (рис. 1). Концентрация креатинина в сыворотке крови крыс между всеми группами исследуемых животных достоверно не различалась.

О степени свободно-радикального окисления в почках при доксорубициновом повреждении мы судили по концентрации продуктов перекисления и активности антиоксидантных ферментов. Доксорубицин вызвал повышение концентрации белковых карбонильных групп на 28% ($p < 0,05$) и малонового диальдегида на 14% ($p < 0,01$), а также снижение содержания восстановленного глутатиона на 14% ($p < 0,01$) в почечном гомогенате по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Флавиновые редуктазы (цитохром-P450 редуктазы, цитохром b_5 -редуктазы, НАДФН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы) способны восстанавливать доксорубицин в клетках из формы хинона до семихинона [10]. В этой форме он является свободным

радикалом и способен восстанавливать кислород до супероксиданион радикала, окисляясь до исходной хиноновой формы [11], что приводит к снижению концентрации восстановленного глутатиона и развитию оксидативного стресса [25].

Глицин предотвратил вызванное доксорубицином повышение концентрации малонового диальдегида и снижение концентрации восстановленного глутатиона в почках крыс, тогда как на увеличение содержания белковых карбонильных групп препарат не повлиял (таблица 2).

Развитию оксидативного стресса в почках крыс доксорубициновой группы способствовал тот факт, что активные формы кислорода, образование которых повысилось под действием антрациклинового антибиотика, могут стимулировать инактивацию антиоксидантных ферментов в корковом веществе почек, что и наблюдалось в данном исследовании. Активность глутатионпероксидазы понизилась на 25% ($p < 0,05$), а глутатионредуктазы на 20% ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными крысами, глицин сохранил активность этих ферментов, что значительно улучшило антиоксидантный статус животных (таблица 2). Достоверных изменений в активности супероксиддисмутазы в почечном гомогенате животных всех групп не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, глицин предупреждает доксорубицин-индуцированный оксидативный стресс и

нарушение функциональной активности почек крыс и может рассматриваться в качестве перспективного средства для профилактики указанной нефропатии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булкина З. П. Противоопухолевые антибиотики: справочник /З. П. Булкина; под ред. В. Г. Пинчук; АН УССР; Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого. – Киев: Наук. думка, 1991. – С. 11-17.
2. Weiss R. B. The antracyclines: will we find a better doxorubicin? /R. B. Weiss //Semin. Oncol. – 1992. – № 19. – P. 670-686.
3. Singal P. K. Doxorubicin-induced cardiopathy /P. K. Singal, N. Illiskovic //N. Engl. J. Med. – 1998. – № 339. – P. 900-905.
4. Гершанович М. Л. Кардиоксан: профилактика кардиотоксичности антрациклинов /М. Л. Гершанович //Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50, № 4. – С. 482-491.
5. Adriamycin-induced nephritic syndrome in rats: sequence of pathologic events /T/ Bertani [et al.] //Lab. Invest. – 1982. – № 46. – P. 16-23.
6. Adriamycin causes hyperlipidemia as a consequence of nephrotoxicity /A. Bizzi [et al.] //Toxicol. Lett. – 1983. – P. 18-29.
7. Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone in rats /S. N. Giri [et al.] //Cancer Chemother. Pharmacol. – 2004. – № 53 (2). – P. 141-150.
8. In vivo site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning antracyclines /M. Binaschi [et al.] //Cancer Res. – 2000. – № 60. – P. 3770-3776.
9. Singal P. K. Subcellular effects of adriamycin in heart: A concise review /P. K. Singal, C. M. Deally, L. E. Weinberg //J. Mol. Cell. Cardiol. – 1987. – № 19. – P. 817-828.
10. Davies K. J. Redox cycling of antracyclines by cardiac mitochondria antracycline radical formation by nadh dehydrogenase /K. J. Davies, J. H. Doroshow //J. Biol. Chem. – 1986. – № 261. – P. 3060-3067.
11. Powis G. Free radical formation by antitumor quinines /G. Powis //Free Radic. Biol. Med. – 1989. – № 6. – P. 63-101.
12. Minotti G. Role of iron in antracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? /G. Minotti, G. Cairo, E. Monti //FASEB J. – 1999. – № 13. P. 199-212.
13. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: Evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy /G. Minotti [et al.] //Cancer Res. – 2001. – № 61. – P. 8422-8428.
14. Doxorubicin induced apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms /S. Wang [et al.] //J. Biol. Chem. – 2004. – № 279. – P. 25535-25543.
15. Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat. Role of manganese, glycine and carotene /M. Ligumsky [et al.] //Scand. J. Gastroenterol. – 1995. – № 30 (9). – P. 854-860.
16. Deters M. Influence of glycine on the damage induced in isolated perfused rat liver by five hepatotoxic agents /M. Deters, C. P. Siegers, O. Strubelt //Toxicology. – 1998. – № 128 (1). – P. 63-72.
17. Shaikh Z. A Protection against chronic cadmium toxicity by glycine /Z. A. Shaikh, W. Tang //Toxicology. – 1999. – № 132 (2-3). – P. 139-146.
18. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding /M. M. Bradford //Anal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-254.
19. Андреева А. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой /А. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А.А. Кишкун //Лабораторное дело. – 1988. – № 41. – С. 41-46.
20. Determination carbonyl content in oxidatively modified proteins /R. L. Levin [et al.] //Methods Enzym. – 1990. – № 186. – P. 464-478.
21. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups /G. L. Ellman //Arch. Biochem. Biophys. – 1972. – № 82. – P. 70-71.
22. Carlberg I. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver /I. Carlberg, B. Mannervik //J. Biol. Chem. – 1975. – № 250. – P. 5475-5480.
23. Beutler E. Red cell metabolism /E. Beutler //Annu. Biochem. Methods. – 1971. – P. 66-68.
24. McCord J. M. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) /J. M. McCord, I. Fridovich //J. Biol. Chem. – 1969. – № 244. – P. 6049-6063.
25. Klatt P. Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress //P. Klatt, S. Lamas //Eur. J. Biochem. – 2000. – № 267. – P. 4928-4944.