

КОРРЕКЦИЯ ПРОИЗВОДНЫМИ ГЛЮКОЗАМИНА ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС В ОПЫТАХ «IN VITRO»

И. А. Зупанец, Е. В. Ветрова, Т. С. Сахарова, В. Е. Доброва

Национальный фармацевтический университет (г. Харьков, Украина)

Поступила в редакцию 18.02.2014 г.

Аннотация. Проведены исследования влияния противоопухолевого антибиотика доксорубицина на клетки костного мозга крыс в условиях «in vitro», а также изучена коррекция его цитотоксичности производными глюкозамина и их комбинациями с флавоноидом кверцетином. Результаты полученных экспериментальных данных свидетельствуют о способности производных глюкозамина снижать дестабилизирующее влияние доксорубицина на клетки костного мозга крыс в условиях «in vitro». Отобраны наиболее перспективные соединения – глюкозамина гидрохлорид и комбинация глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина с кверцетином, которые представляют интерес для дальнейшего изучения в качестве возможных корректоров токсического действия антрациклиновых противоопухолевых антибиотиков.

Ключевые слова: костный мозг, доксорубин, производные глюкозамина, кверцетин, цитотоксичность.

Abstract. The studies of the effect of the antitumor antibiotic doxorubicin were conducted on cells of bone marrow of rats under «in vitro», and studied correction of its cytotoxicity with derivatives of glucosamine and its combinations with the flavonoid quercetin. The results of the experiment demonstrate the ability of derivatives of glucosamine to reduce the destabilizing effect of doxorubicin on cells of bone marrow of rats under «in vitro». It were selected the most perspective compounds – glucosamine hydrochloride and the combination of glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine with quercetin, which are of interest for further study as a possible correctors of toxic action of anthracycline antitumor antibiotics.

Keywords: bone marrow, doxorubicin, derivatives of glucosamine, quercetin, cytotoxicity.

На сегодняшний день во всем мире спорным остается вопрос о целесообразности использования лабораторных животных в биологическом эксперименте [1]. Обоснованным является разработка альтернативных методов исследования, которые предусматривают замену животных на культуры тканей и клеточные объекты [2, 3].

Особо важным представляется изучение на клеточных объектах лекарственных препаратов с прогнозируемой цитотоксичностью, в частности противоопухолевых препаратов, для поиска возможных путей ее фармакокоррекции. В практической онкологии одной из наиболее широко при-

меняемых групп противоопухолевых препаратов являются антрациклиновые антибиотики, в частности доксорубин [4, 5, 6]. Наравне с высокой эффективностью доксорубин характеризуется низкой избирательностью действия, что приводит к большому числу побочных эффектов [4, 7]. Перспективными соединениями для коррекции цитотоксического действия доксорубицина представляются производные глюкозамина, а также их комбинации с другими компонентами природного происхождения, например флавоноидами. Глюкозамин и его производные являются естественными метаболитами организма человека и животных, выполняя в организме многочисленные биологические функции. С другой стороны, результаты многих научных исследований убедительно до-

© Зупанец И. А., Ветрова Е. В., Сахарова Т. С., Доброва В. Е., 2014

казывают, что экзогенный глюкозамин и его производные обладают выраженной нефро-, гепато-, кардио-, гастропротекторной и другими видами активности [8, 9]. Среди флавоноидов наиболее изученным является кверцетин, который обладает антиоксидантными, мембранопротекторными свойствами, оказывает регулирующее влияние на ферментативные системы, иммунные и обменные процессы в организме. Препараты кверцетина нашли применение при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, а также имеются сведения о позитивном его использовании в качестве лечебного и профилактического средства при онкологических заболеваниях [12, 13, 14].

Исходя из вышесказанного целью нашей работы стало изучение эффективности использования глюкозамина гидрохлорида и комбинации аминокислот ГА г/х, N-ацетилглюкозамина с флавоноидом кверцетином для коррекции цитотоксического действия противоопухолевого антибиотика доксорубицина в опытах «in vitro».

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование проведено по валидированной методике, разработанной учеными Национального фармацевтического университета, позволяющей оценить влияние различных дестабилизирующих факторов на клетки костного мозга крыс в условиях «in vitro» [2, 15]. Выбор методики с использованием в качестве биологического объекта клеток костного мозга обусловлен тропностью доксорубицина (DOX) к быстропролиферирующим клеткам, чем определяется его гематотоксичность. С другой стороны, целесообразность использования клеток костного мозга в качестве альтернативного биологического объекта объясняется простотой их получения, а также экономической доступностью методики [3, 16].

В опытах использовано 40 нелинейных крыс-самок массой 200-220 г, эвтаназию которых осуществляли с соблюдением принципов «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986) и IV-го Национального конгресса по биоэтике (Киев, 2010). В соответствии с методикой, суспензию клеток костного мозга получали из трубчатых костей верхних и нижних конечностей белых крыс путем их вымывания физиологическим раствором. Из полученной суспензии отбирали пробы в объеме 0,5 мл, которые затем окрашивали трипановым синим. Окрашенными образцами заполняли

камеру Горяева, в которой проводили подсчет живых и мертвых клеток. Мертвые клетки определялись по окрашиванию их в фиолетовый цвет. Для воспроизводимости исследования измерения повторяли на 10 образцах в каждой из исследуемых проб. Учитывалась средняя доля мертвых клеток (%), которую оценивали через 30 минут после воздействия исследуемых объектов [2, 17].

На 1-ом этапе исследования проводилась оценка жизнеспособности клеток костного мозга в интактной пробе. В соответствии с валидационным протоколом и отчетом данной методики средняя доля мертвых клеток в контрольной пробе через 30 минут после приготовления суспензии должна соответствовать $6,0 \pm 1,4$ % [15]. На 2-ом этапе эксперимента определялась LC50 DOX – концентрация DOX, которая ведет к гибели 50 % клеток костного мозга в образце. В качестве дестабилизирующего агента был выбран «Доксорубин-КМП» (ПАО «Киевмедпрепарат»). На заключительном этапе исследования было поставлено 8 опытов по определению влияния исследуемых веществ в разных концентрациях на способность снижать среднюю долю мертвых клеток костного мозга в пробах с добавлением DOX в концентрации LC50. 1-я серия проб – контрольная, 2-я проба – суспензия клеток костного мозга крыс с добавлением DOX в концентрации LC50 в соотношении 1:1, 3-5 – пробы, с добавлением в суспензию глюкозамина гидрохлорида (ГА г/х) в концентрациях – 100, 50, 10 мкг/мл соответственно с добавлением DOX в концентрации LC50 в соотношении 1:1 и 6-8 – пробы суспензии клеток костного мозга крыс с добавлением комбинации аминокислот ГА г/х, N-ацетилглюкозамина с флавоноидом кверцетином (КА+Кв) в концентрациях – 100, 50, 10 мкг/мл соответственно с добавлением DOX в концентрации LC50 в соотношении 1:1 (производные глюкозамина и кверцетин в КА+Кв находятся в соотношении 3:1 в пересчете на ГА г/х). Диапазон концентраций исследуемых объектов выбран согласно проведенным ранее экспериментам в условиях «in vitro» [18]. Результаты эксперимента обрабатывались с помощью метода описательной статистики, достоверность отличий при учете результатов рассчитывалась с помощью метода множественного сравнения Крускала-Воллиса, проверка гипотез проводилась с помощью Z-критерия. Статистическое обобщение результатов эксперимента проводилось с использованием программного пакета «StatSoft».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе определения жизнеспособности клеток костного мозга нами установлено, что в интактной пробе через 30 минут после приготовления суспензии средняя доля мертвых клеток находилась на уровне $6,04 \pm 0,7\%$, что полностью соответствует валидационным характеристикам для данной методики. Для определения LC50 DOX были выбраны концентрации в широком диапазоне – от 10 мг/мл до 0,1 мг/мл. Результаты опытов показали, что при добавлении DOX в концентрациях 10 и 5 мг/мл доля мертвых клеток составила 100 %. В концентрации 3 мг/мл цитотоксичность определялась на уровне $87,03 \pm 2,94\%$, в концентрации 2 мг/мл – $68,5 \pm 4,16\%$, а в концентрации 1 мг/мл – $34,5 \pm 4,05\%$ (рис. 1). В ходе опытов была рассчитана концентрация DOX, вызывающая гибель 50 % клеток костного мозга крыс (LC50) – 1,7 мг/мл.

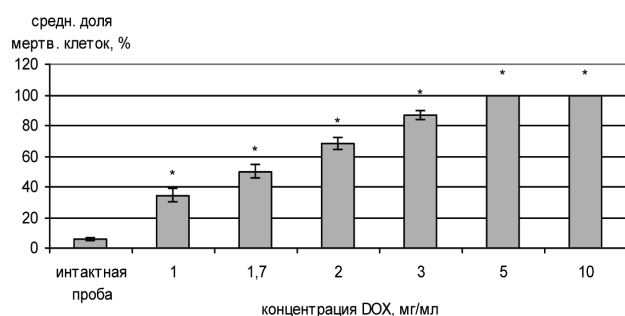


Рис. 1. Оценка дестабилизирующего действия DOX в зависимости от концентрации. Примечание: * достоверность относительно интактной пробы ($p < 0,05$)

Далее определяли способность исследуемых объектов снижать среднюю долю мертвых клеток костного мозга в пробах с добавлением LC50 DOX. Контролем служили интактная проба и проба с добавлением DOX в дозе LC50. В пробе с добавлением DOX в дозе LC50 (контрольная проба) через 30 минут после начала эксперимента средняя доля мертвых клеток костного мозга в 8,3 раза превышала долю мертвых клеток в интактной пробе и составляла $50,04 \pm 2,7\%$. Все исследуемые объекты в разных концентрациях и в разной степени нивелировали цитотоксический эффект, вызванный DOX, снижая среднюю долю мертвых клеток. В пробах с добавлением ГА г/х на фоне DOX в дозе LC50 соотношение мертвых и живых клеток изменялось в зависимости от концентрации. В концентрации ГА г/х 100 мкг/мл доля мертвых клеток составляла $41,15 \pm 2,31\%$. А в концентрациях ГА г/х 50 мкг/мл и 10 мкг/мл процент

мертвых клеток костного мозга составлял $30,10 \pm 2,26$ и $26,12 \pm 2,10\%$ соответственно, что было достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в контрольной пробе – с добавлением только DOX в дозе LC50. В образцах с добавлением КА+Кв в разных концентрациях на фоне DOX в дозе LC50 результаты были следующими: при добавлении концентрации 100 мкг/мл доля мертвых клеток составляла $44,67 \pm 2,48\%$, в концентрации 50 мкг/мл – $40,23 \pm 2,23\%$. Достоверное снижение ($p < 0,05$) средней доли мертвых клеток относительно пробы с добавлением DOX в дозе LC50 наблюдалось в концентрации 10 мкг/мл – $36,28 \pm 2,20\%$. Графическое изображение средней доли мертвых клеток костного мозга крыс в исследуемых группах представлено на рисунке 2.

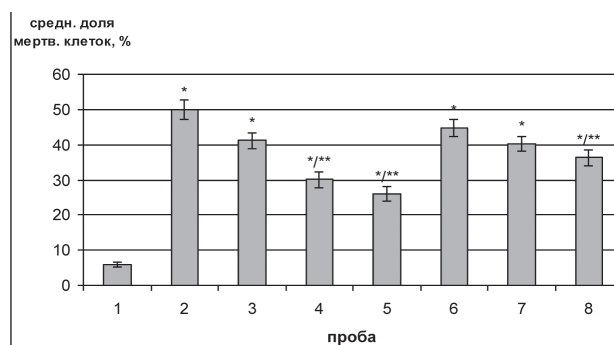


Рис. 2. Влияние производных глюкозамина и их комбинаций с кверцетином на цитотоксические проявления DOX в дозе LC50. Примечание: 1 – интактная проба; 2 – проба с добавлением DOX в дозе LC50 (контрольная проба); 3 – DOX 1,7 мг/мл + ГА г/х 100 мкг/мл; 4 – DOX 1,7 мг/мл + ГА г/х 50 мкг/мл; 5 – DOX 1,7 мг/мл + ГА г/х 10 мкг/мл; 6 – DOX 1,7 мг/мл + КА+Кв 100 мкг/мл; 7 – DOX 1,7 мг/мл + КА+Кв 50 мкг/мл; 8 – DOX 1,7 мг/мл + КА+Кв 10 мкг/мл. * достоверность относительно контрольной пробы ($p < 0,05$), ** достоверность относительно пробы LC50 DOX ($p < 0,05$)

В наших опытах прослеживалась обратно-пропорциональная зависимость в ряду «концентрация – цитопротекторное действие»: снижение концентрации исследуемых объектов вело к увеличению средней доли живых клеток костного мозга крыс. Вероятно, повышение концентрации производных глюкозамина в среде с добавлением DOX приводило к усилению дестабилизирующих воздействий на клетки костного мозга крыс за счет изменения (подкисления) pH среды и увеличения её осмолярности. В более низких концентрациях производные глюкозамина оказывали выраженное цитопротекторное действие на

клетки костного мозга крыс, что подтверждалось увеличением средней доли живых клеток в исследуемых пробах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально доказано цитотоксическое действие доксорубицина на клетки костного мозга крыс в условиях «in vitro». Рассчитана LC_{50} доксорубицина, которая составила 1,7 мг/мл.

Доказано наличие цитопротекторного действия глюкозамина гидрохлорида и комбинации аминсахаров глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина с флавоноидом кверцетином на клетки костного мозга крыс благодаря которому нивелируется дестабилизирующее влияние доксорубицина в дозе LC_{50} .

Установлена обратнопропорциональная зависимость в ряду «концентрация – цитопротекторное действие»: с понижением концентрации исследуемых объектов средняя доля живых клеток костного мозга крыс увеличивалась.

Выбраны три наиболее эффективные концентрации исследуемых объектов – глюкозамина гидрохлорид в дозах 10 мкг/мл и 50 мкг/мл и комбинация аминсахаров глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина с флавоноидом кверцетином в дозе 10 мкг/мл – которые статистически достоверно ($p < 0,05$) позволяют детализировать предварительный скрининг исследуемых веществ, а также дают возможность получить дополнительную информацию об их свойствах как корректоров цитотоксичности доксорубицина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коваленко В.Н. Альтернативные методы в доклиническом изучении токсичности лекарственных средств [Электронный ресурс] / В.Н. Коваленко // Сучасні проблеми токсикології. — 2002. — № 4. — Режим доступа до журн. : http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2002/02_4_3.htm
2. Разработка альтернативной методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на биологические объекты на модели in vitro / В.Е. Добрава [и др.] // Фармация Казахстана: интеграция науки, образования, производства : тезисы докл. междунар. науч.-практ. конф. — Казахстан, 2009. — С. 45-49.
3. Цитотоксичность карборанилсодержащих соединений / Г.А. Данлыбаева [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. — 2012. — № 3. — С. 49-54.

4. Шишацкая Е.И. Исследование лекарственной эффективности доксорубицина, депонированного в микрочастицы из резорбируемого «Биопластотана», на лабораторных животных с солидной формой карциномы Эрлиха / Е.И. Шишацкая А.В. Горева, А.М. Кузьмина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2012. — Т. 154, № 12. — С. 741-745.

5. Использование липосомальной формы антибиотиков антрациклинового ряда в лечении экспериментальных форм опухолевых процессов / С.А. Шалимов [и др.] // Український хіміотерапевтичний журнал. — 2004. — № 1/2. — С. 65-68.

6. Механизмы угнетения и восстановления гемопоеза у больных раком молочной железы в условиях химиотерапии по схеме доксорубин/доцетаксел / В.Е. Гольдберг [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2011. — № 6. — С. 5-9.

7. Напалкова С.М. Влияние глицина на функциональные и оксидативные показатели почек крыс в условиях доксорубициновой нефропатии / С.М. Напалкова, О.С. Селиванова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2006. — № 1. — С. 146-149.

8. Туляков В.О. Фармакологічні властивості глюкозаміну / В.О.Туляков, К.О. Зупанець, С.К. Шебеко // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2009. — № 2. — С. 3-8.

9. Туляков В.О. Протекторні властивості глюкозаміну / В.О.Туляков, К.О. Зупанець, С.К. Шебеко // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2009. — № 3. — С. 3-9.

10. Quercetin liposomes protect against radiation-induced pulmonary injury in a murine model / Hao Liu [et al.] // Oncology Letters. — 2013. — N 6. — P. 453-459.

11. Мохорт М.А. Фармакодинаміка кверцетину та його лікарських форм / М.А. Мохорт, І.В. Данова, С.О. Мисливець // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2009. — № 6. — С. 3-7.

12. Роговский В.С. Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза / В.С. Роговский, А.И. Матюшин, Н.Л. Шимановский // Международный медицинский журнал. — 2011. — № 3. — С. 114-118.

13. Флавоноид кверцетин — мощное оружие против комплекса болезней цивилизации [Электронный ресурс] // Medical Nature. — 2013. — № 1. — С. 6-9. Режим доступа к журналу : http://health-ua.com/pics/pdf/ZU_2013_MN_13/06-09.pdf

14. Кудринская В.А. Синтез и исследование сорбционных свойств полимеров с молекулярными отпечатками кверцетина / В.А. Кудринская, С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Золотов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. — 2009. — Т. 50, № 3. — С. 156-163.

15. Валідація методики визначення впливу дестабілізуючих чинників на моделі кісткового мозку шурів / В.Є. Добрава [и др.] // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 15, № 2. — С. 18-21.

16. Маркова В.М. Модификация метода Шрека для определения антитоксической активности

препаратов и вновь синтезированных соединений // Тез. докл. III съезда фармацевтов Туркменской ССР. — Ашхабад, 1987. — С. 225-226.

17. Пат. 95489 України на винахід, МПК G 01 N 33/483 (2006.01). Спосіб визначення цитотоксичної / цитопротекторної дії дестабілізуючих факторів / В.Є. Добрава [и др.] — №а 2009 01726; заявл. 27.02.09; опубл. 10.08.11, Бюл. № 15.

18. Остеоартроз: консервативная терапия : монография / Н.А. Корж [и др.]. — Харьков: Золотые страницы, 2007. — С. 234-235.

Зупанец Игорь Альбертович — доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и клинической фармации Национального фармацевтического университета; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Ветрова Екатерина Викторовна — соискатель кафедры клинической фармакологии и клинической фармации Национального фармацевтического университета; e-mail: vkv-katya@rambler.ru

Сахарова Татьяна Семеновна — доктор фарм. наук, профессор кафедры клинической фармакологии и клинической фармации Национального фармацевтического университета; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Добрава Виктория Евгеньевна — доктор фарм. наук, профессор кафедры клинической фармакологии и клинической фармации Национального фармацевтического университета; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Zupanets Igor A. — doctor of medicine, professor, chair of the department of clinical pharmacology and clinical pharmacy, National University of Pharmacy; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Vetrova Ekaterina V. — competitor of the department of clinical pharmacology and clinical pharmacy, National University of Pharmacy; e-mail: vkv-katya@rambler.ru

Sakharova Tatyana S. — doctor of pharmaceutical sciences, professor of the department of clinical pharmacology and clinical pharmacy, National University of Pharmacy; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua

Dobrova Victoria E. — doctor of pharmaceutical sciences, professor of the department of clinical pharmacology and clinical pharmacy, National University of Pharmacy; e-mail: clinpharm@ukrfa.kharkov.ua