

УДК 615.739.6:616.61-08

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ВЫРАЖЕННОСТИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ ДОКСОРУБИЦИНОВОГО ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК У КРЫС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЛИЦИНА

О.С. Селиванова, С.М. Напалкова

Ульяновский государственный университет

В работе рассмотрено влияние глицина на функциональные показатели почек крыс в условиях доксорубицинового повреждения, а также на выраженность оксидативного стресса (уровень маркеров и активность антиоксидантных ферментов в почечном гомогенате). Дана оценка изменений указанных показателей при применении глицина по сравнению с мелатонином.

Ключевые слова: доксорубициновая нефропатия, оксидативный стресс, глицин, мелатонин.

Доксорубицин (адриамицин) является одним из самых востребованных цитостатиков и используется в химиотерапии гемобластозов и солидных злокачественных опухолей [3; 27; 29]. Он оказывает противобластомный эффект как в монотерапии, так и в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами. Ценным свойством антибиотика является отсутствие перекрестной резистентности с цитостатическими средствами других групп [3].

Трудно назвать злокачественные новообразования, не входящие в список показаний к применению этого антибиотика [4]. Однако возможности химиотерапии злокачественных опухолей с использованием доксорубицина ограничиваются системными токсическими эффектами препарата в отношении как сердца [4; 9; 17; 23; 27], так и почек [6; 13; 17]. Этот факт обуславливает жесткие ограничения суммарной дозы препарата (до 500 мг/м²) и требует поиска эффективных протекторных средств [7].

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 [17].

Несмотря на широкое применение в клинике, механизм токсического действия антрациклиновых антибиотиков в отношении нормальных тканей остается до настоящего времени спорным. Выдвинуто несколько гипотез объяснения антрациклиновой цитотоксичности: 1) свободно-радикальная; 2) нарушение внутриклеточного гомеостаза кальция и железа; 3) ингибирование ферментов репликации ДНК, 4) образование высокотоксичных метаболитов антрациклинов и др.

Из перечисленных механизмов наименьшее значение для цитостатического действия на опухоль и, наоборот, наибольшее для токсического в отношении нормальных тканей имеет образование свободных радикалов кислорода [27]. Различия в механизмах противоопухолевого и токсического действия антрациклинов создают принципиальные предпосылки для применения патогенетически действующих протекторов без ущерба для противоопухолевого эффекта [4; 28].

Исследования последних лет показали, что перспективным подходом к снижению действия повреждающих факторов, в основе которых лежат процессы образования активных форм кислорода, является поиск веществ-метаболитов, способных индуцировать внутриклеточную защиту путем индукции синтеза или активации антиоксидантных фер-

ментов, к которым относится аминокислота глицин [5; 8; 23].

Благодаря своим антиоксидантным свойствам глицин может рассматриваться как потенциальный протектор при доксорубициновых нефропатиях, в основе развития которых лежит активация процессов перекисного окисления липидов.

Цель исследования. Изучение нефропротекторных свойств глицина на доксорубициновой модели повреждения почек у крыс.

Материалы и методы. Исследуемым веществом явилась аминокислота глицин (Glycinum). В работе глицин использовался в форме таблеток по 100 мг (ФГУП «Мосхимфармперпараты» им. Н.А. Семашко, г. Москва). При выборе дозы препарата (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно) мы опирались на исследования В.П. Такунова [10], который применял глицин из расчета 55 мг/кг у крыс для определения его влияния на вестибулярные рефлексы. М. Ligumsky с соавторами изучали на крысах протекторные свойства глицина в дозе 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно на модели этанолового поражения слизистой оболочки желудка [18]. В этой же дозе (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно) препарат применялся у крыс для исследования возможности коррекции кар-

диотоксических эффектов противоопухолевых антибиотиков в работе Г.Т. Брынских [2]. Доза глицина 50 мг/кг составляет 1/60 от LD₅₀.

Для воспроизведения антрациклинового поражения почек применялся доксорубицин гидрохлорид (Doxorubicini hydrochloridum). В работе использовался Доксорубицин-ЛЭНС® в виде лиофилизованного порошка во флаконах по 10 мг (ООО «ЛЭНС-ФАРМ», дочерняя компания ЗАО «Верофарм», г. Москва).

В качестве сравнения в исследовании применялся мелатонин (препарат Мелаксен (Melaxen®) в таблетках, покрытых оболочкой, по 3 мг (Unipharm, Inc. New York, USA)). Доза препарата (10 мг/кг) выбиралась с опорой на работу P. Dziegiel и соавт. [15], где исследовалась протекторная активность мелатонина в эксперименте на крысах в дозе 10 мг/кг, вводимого за 30 минут до инъекций доксорубицина.

Работа выполнена на 42 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах весом 240–290 г, содержащихся в стандартных условиях вивария (12 часовой цикл дня/ночи; t=20–25 °С; влажность – 40–45 %) и имеющих свободный доступ к воде и пище. Животные были разделены на шесть равных групп (табл. 1).

Таблица 1

Схема проведения эксперимента

п/п	Условия эксперимента	Количество животных
1	<i>Интakтные животные</i>	n=7
2	<i>Контрольные животные (0,5 мл 0,9 % NaCl однократно внутривнутрибрюшинно)</i>	n=7
3	<i>Доксорубицин (7,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно однократно)</i>	n=7
4	<i>Мелатонин (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно) за 30 минут до инъекции доксорубицина</i>	n=7
5	<i>Глицин (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно) за 30 минут до инъекции доксорубицина</i>	n=7
6	<i>Глицин (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно однократно)</i>	n=7

Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводились под общим наркозом (этаминал-натрий из расчета 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно). Животные умерщвлялись путем декапитации. При этом производился забор

крови путем пункции сердца для исследования концентрации креатинина, мочевины и глутатионпероксидазы. Моча забиралась из мочевого пузыря для определения концентрации общего белка.

Немедленно после забора биологических жидкостей левая почка удалялась и взвешивалась. В дальнейшем гомогенат почки использовался для изучения показателей перекисного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы.

Применяемая нами схема введения антрациклинового антибиотика для индукции доксорубициновой нефропатии часто применяется и является превосходной моделью нефротического синдрома на животных, подобного нефропатии с минимальными изменениями, с фокальным и сегментарным гломерулосклерозом у людей [11; 23; 31]. Доксорубицин вводился крысам внутрибрюшинно однократно в дозе 7,5 мг/кг веса животного, вызванные им изменения в почках оценивались на седьмые сутки.

Концентрацию креатинина в сыворотке крови определяли по методу Н. Поррер [24]. Концентрацию мочевины в сыворотке крови определяли с помощью коммерческого набора фирмы «Ольвекс» (Москва) методом, основанном на реакции с диацетилмонооксидом. Активность глутатионпероксидазы в сыворотке крови определялась по методу R. Beutler [12]. Активность реакции измерялась спектрофотометрически при $\lambda=340$ нм (спектрометр СФ-46, Россия).

Для приготовления общей цитоплазматической фракции почку растирали в гомогенизаторе Поттера с буфером, содержащим 0,1 М раствор КСl, 1 мМ раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 20 мМ раствор Трис-НСl (рН=7,0), 1 мМ фенилметилсульфанил фторида. Далее экстракт центрифугировали при 10000 g, супернатант разливали по пластиковым пробиркам V=0,2 мл и хранили до использования при t= -20 °С. Концентрация малонового диальдегида определялась по методу Л.Б. Андреевой в реакции с тиобарбитуровой кислотой [1]. Содержание белковых карбонильных групп определяли по методике R.L. Levin и соавт. [22]. Концентрацию глутатиона восстановленного определяли в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой (ДНТБ) [16]. Активность глутатионредуктазы определялась спектрофотометрически по методу, предложенному I. Carlberg и соавт. [14]. Активность суперок-

сиддисмутаза определялась в реакции с ксантиноксидазой [20].

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 и обсуждение. Введение изотонического раствора контрольным животным по схеме, аналогичной введению антрациклинового антибиотика, а также применение только глицина не привели к достоверным изменениям изучаемых показателей по сравнению с животными интактной группы.

Изучение функциональных показателей почек крыс: однократное введение доксорубина привело к повышению концентрации мочевины на 40 % по сравнению с контрольными животными ($p < 0,001$), концентрация составила $26,58 \pm 0,37$ мг/100 мл сыво-

ротки крови животных, что было предупреждено превентивным применением как мелатонина, так и глицина ($19,02 \pm 0,48$ и $19,25 \pm 0,53$ мг/100 мл сыворотки крови соответственно; $p < 0,001$ для обеих групп по сравнению с группой животных, получавших только доксорубин; рис. 1).

У животных, получавших только доксорубин, концентрация общего белка в моче была в 17 раз выше, чем у контрольных животных ($92,82 \pm 11,77$ и $5,11 \pm 1,48$ мг/мл мочи соответственно; $p < 0,001$) (рис. 2).

И мелатонин, и глицин уменьшили выраженность протеинурии ($20,00 \pm 5,15$ и $12,41 \pm 3,16$ мг/мл мочи соответственно, $p < 0,001$ для обеих групп по сравнению с животными, получавшими только доксорубин; рис. 2). Под действием глицина она уменьшилась в 8 раз, а мелатонина – лишь в 5 раз. При этом концентрация белка в моче животных мелатониновой группы достоверно различалась по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$).

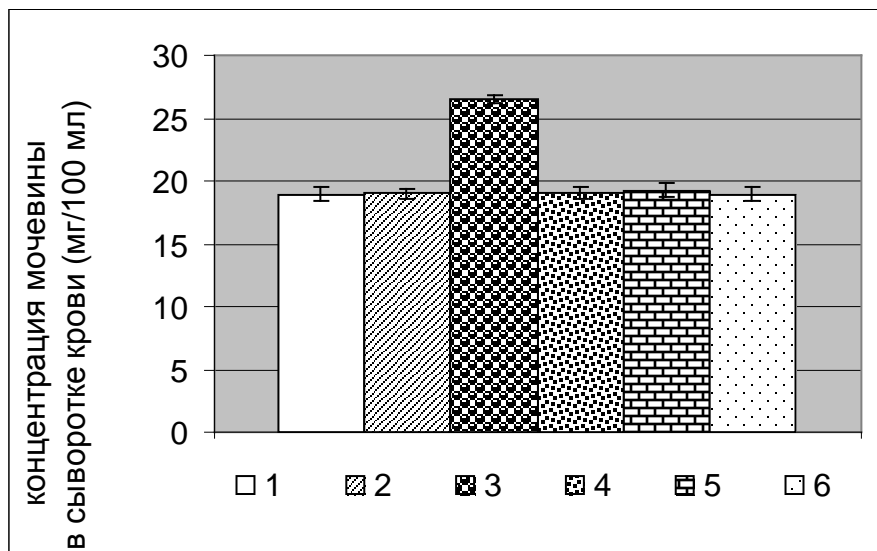


Рис. 1. Влияние исследуемых препаратов на концентрацию мочевины в сыворотке крови животных (доксорубиновая модель): 1 – интактные животные; 2 – контроль; 3 – доксорубин; 4 – мелатонин + доксорубин; 5 – глицин + доксорубин; 6 – глицин

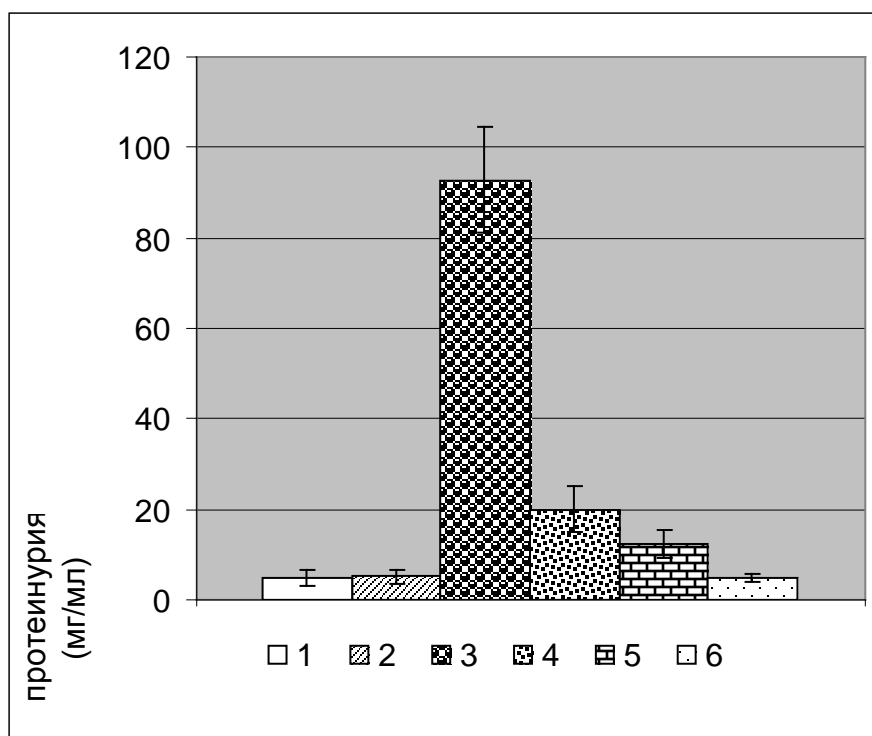


Рис. 2. Влияние исследуемых препаратов на концентрацию общего белка в моче у крыс (доксорубициновая модель): 1 – интактные животные; 2 – контроль; 3 – доксорубицин; 4 – мелатонин + доксорубицин; 5 – глицин + доксорубицин; 6 – глицин

Известно, что при доксорубициновом поражении почек повреждается преимущественно клубочковая структура, чем и обусловлена выраженная протеинурия [8; 13]. Данные, полученные в ходе гистологического исследования, подтвердили этот факт.

Исследование содержания показателей оксидативного стресса и активности антиоксидантных ферментов в гомогенате почек крыс: доксорубицин вызвал увеличение со-

держания белковых карбонильных групп в почечном гомогенате крыс на 28 % по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$; табл. 2). Концентрация белковых карбонильных групп в почечной ткани животных, получавших за 30 минут до инъекции антибиотика как мелатонин, так и глицин, достоверно не отличалась от контрольных животных и животных, получавших только доксорубицин.

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов на содержание показателей оксидативного стресса в почках животных

Группа	Карбонильные группы, ммоль/мг белка	Малоновый диальдегид, ммоль/мг белка	Восстановленный глутатион, мкг/мг белка
1	2,02±0,12	1,92±0,07	2,73±0,05
2	2,06±0,18	1,90±0,05	2,75±0,08
3	2,64±0,16 ^{Δ °}	2,17±0,06 ^{ΔΔ ∞∞}	2,34±0,08 ^{ΔΔ ∞∞}
4	2,16±0,10	1,98±0,05 *	2,60±0,08
5	2,19±0,08	1,93±0,06 *	2,71±0,06 **
6	2,04±0,12	1,88±0,10	2,76±0,09

Примечания: 1. 1 – интактные животные; 2 – контроль; 3 – доксорубин; 4 – мелатонин + доксорубин; 5 – глицин + доксорубин; 6 – глицин.

2. Статистически достоверно по сравнению с интактной группой Δ при $p < 0,05$ и $\Delta\Delta$ – при $p < 0,01$; с контрольной группой \circ – при $p < 0,05$ и $\circ\circ$ – при $p < 0,01$; с группой животных, получавших только доксорубин, * – при $p < 0,05$ и ** – при $p < 0,01$.

На седьмые сутки после введения адриамицина наблюдалось увеличение концентрации малонового диальдегида в почках крыс на 14 % по сравнению с контрольными животными ($p < 0,01$). Превентивное применение и мелатонина, и глицина до инъекции доксорубина позволило предупредить повышение концентрации малонового диальдегида в почечном гомогенате ($p < 0,05$ для обеих групп по сравнению с группой животных, получавших только доксорубин; табл. 2).

Содержание восстановленного глутатиона в гомогенате почек животных, получавших только доксорубин, было на 14 % ниже, чем у животных контрольной группы ($p < 0,01$). Глицин, но не мелатонин, предупредил снижение концентрации восстановленного глутатиона, вызванное доксорубицином ($p < 0,01$ по сравнению с группой жи-

вотных, получавших только доксорубин; табл. 2).

Известно, что помимо развития оксидативного стресса доксорубин вызывает снижение активности ферментов антиоксидантной защиты в ткани почек животных [19; 26; 30]. Мы получили данные, что однократное введение антрациклина привело к снижению активности глутатионпероксидазы в ткани почек животных на 25 % по сравнению с контрольными животными (с $1,93 \pm 0,13$ до $1,44 \pm 0,06$ мкмоль/мин/мг белка; $p < 0,05$), под влиянием мелатонина активность данного фермента сохранилась на уровне $1,91 \pm 0,05$ мкмоль/мин/мг белка ($p < 0,001$ по сравнению с животными, получавшими только доксорубин), а глицина – на уровне $1,86 \pm 0,08$ мкмоль/мин/мг белка ($p < 0,01$ по сравнению с животными, получавшими только доксорубин; рис. 3).

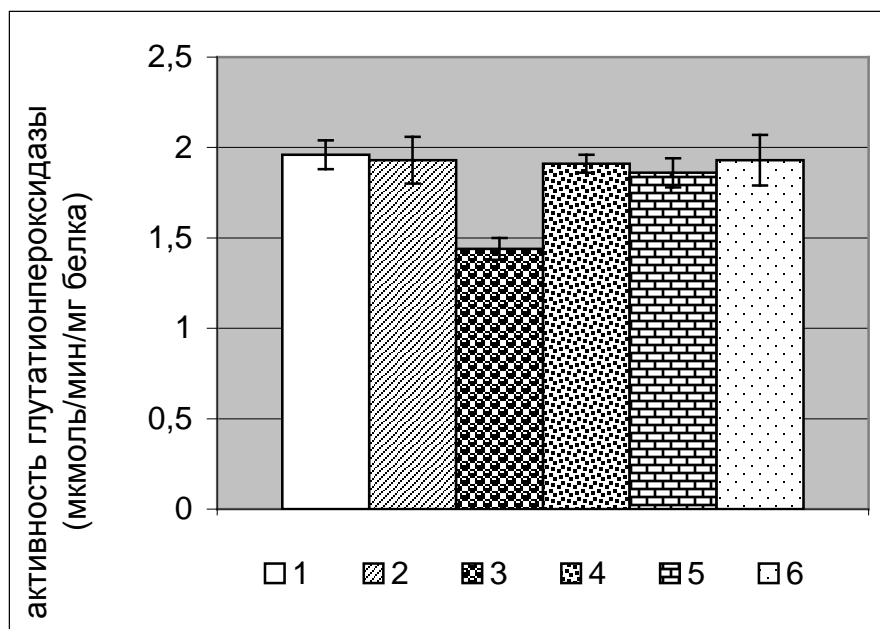


Рис. 3. Влияние исследуемых препаратов на активность глутатионпероксидазы в ткани почек крыс:

1 – интактные животные; 2 – контроль; 3 – доксорубин; 4 – мелатонин + доксорубин; 5 – глицин + доксорубин; 6 – глицин

Введение доксорубина вызвало снижение активности глутатионредуктазы в почечном гомогенате крыс на 20 % по сравне-

нию с контрольными животными (с $5,39 \pm 0,18$ до $4,29 \pm 0,11$ нмоль/мин/мг белка; $p < 0,01$). Предварительное введение как мелатонина,

так и глицина позволило предупредить снижение активности фермента в почечной ткани ($5,14 \pm 0,08$ и $5,32 \pm 0,10$ нмоль/мин/мг белка

соответственно; $p < 0,001$ для обеих групп по сравнению с группой животных, получавших только доксорубицин; рис. 4).

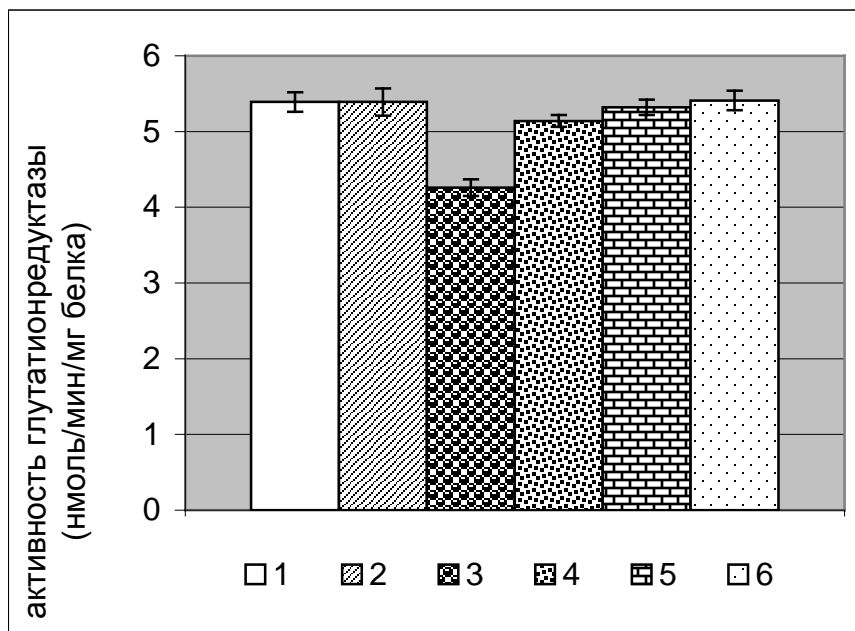


Рис. 4. Влияние исследуемых препаратов на активность глутатионредуктазы в гомогенате почек животных:

1 – интактные животные; 2 – контроль; 3 – доксорубицин; 4 – мелатонин + доксорубицин; 5 – глицин + доксорубицин; 6 – глицин

Наличие у глицина более выраженных нефропротекторных свойств по сравнению с мелатонином было подтверждено тем, что аминокислота предотвратила протеинурию и понижение концентрации восстановленного глутатиона в почках животных, а также благоприятно повлияла на структурные изменения в почках животных, индуцированные доксорубицином.

Выводы. Глицин обладает свойствами нефропротектора в условиях доксорубицинового повреждения почек у крыс. Он препятствует развитию доксорубицин-индуцированного оксидативного стресса и ослаблению антиоксидантной защиты в почках, что позволяет устранить вызванную антибиотиком азотемию и уменьшить выраженность протеинурии у крыс. Протекторная активность глицина не уступает, а по некоторым параметрам даже превосходит эффективность мелатонина в условиях доксорубицинового повреждения почек животных.

битуровой кислотой / А.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – №41. – С. 41–46.

2. Биохимические показатели в диагностике нефротоксичности противоопухолевой химиотерапии у детей / Н.В. Любимова и др. // Вопросы онкологии. – 1997. – Т. 43. – №4. – С. 448–453.

3. Брынских, Г.Т. Экспериментальное исследование возможности коррекции глицином кардиотоксических эффектов противоопухолевых антибиотиков : дис. ... канд. биол. наук / Г.Т. Брынских. – Купавна, 2005. – 145 с.

4. Булкина, З.П. Противоопухолевые антибиотики : справ. / З.П. Булкина ; под ред. В.Г. Пинчук ; АН УССР. Институт проблем онкологии им. Р.Е. Кавецкого. – К. : Наукова думка. – 1991. – С. 11–17.

5. Гершанович, М.Л. Кардиоксан: профилактика кардиотоксичности антрациклинов / М.Л. Гершанович // Вопросы онкологии. – 2004. – Т. 50. – №4. – С. 482–491.

6. Непомнящих, Л.М. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Д.Е. Семенов. – М. : Изд-во РАМН, 2003. – 255 с.

7. Ограничение гипероксидации липидов и предупреждение стрессорных повреждений сердца производными глицина / В.В. Мальшев и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1996. – Т. 56. – №5. – С. 23–25.

1. Андреева, А.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобар-

8. *Парфенов, В.А.* Метаболическая терапия ишемического инсульта / В.А. Парфенов // Русский медицинский журн. – 2002. – Т. 10. – №25. – С. 27–34.
9. *Семиглазов, В.Ф.* Предупреждение кардиотоксического действия антрациклинов с помощью кардиоксана / В.Ф. Семиглазов // Вопросы онкологии. – 1997. – Т. 43. – №6. – С. 569–574.
10. *Такунов, В.П.* Влияние глицина и ГАМК на вестибулярные рефлексы в эксперименте / В.П. Такунов // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов ; под ред. Г.В. Ковалева. – Волгоград, 1985. – С. 80–93.
11. *Adriamycin causes hyperlipidemia as a consequence of nephrotoxicity / A. Bizzi et al. // Toxicol. Lett.: 18–29 (1983).*
12. *Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events / T. Bertani et al. // Lab. Invest., 46: 16–23 (1982).*
13. *Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone in rats / S.N. Giri et al. // Cancer. Chemother. Pharmacol., 53(2):141–150 (2004).*
14. *Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat. Role of manganese, glycine and carotene / M. Ligumsky et al. // Scand. J. Gastroenterol., 30 (9): 854–860 (1995).*
15. *Antracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity / G. Minotti et al. // Pharmacol. Rev., 56: 185–229 (2004).*
16. *Beutler, E.* Red cell metabolism / E. Beutler // *Annu. Biochem. Methods: 66–68 (1971).*
17. *Carlberg, I.* Purification and characterization of flavoenzyme glytathione reductase from rat liver / I. Carlberg, B. Mannervik // *J. Biol. Chem., 250: 5475–5480 (1975).*
18. *Determination carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levin et al. // Methods Enzym., 186: 464–478 (1990).*
19. *Doxorubicin induced apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms / S. Wang et al. // J. Biol. Chem., 279: 25535–25543 (2004).*
20. *Ellman, G.L.* Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys., 82: 70–71 (1972).*
21. *Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model / M. Omasa et al. // Transplantation, 75(5): 591–598 (2003).*
22. *ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats / T. Zima et al. // Nephrol. Dial. Transplant., 13: 1975–1979 (1998).*
23. *Low-protein diet prevents glomerular damage in adriamycin-treated rats / G. Remuzzi et al. // Kidney Int., 28: 21–27 (1985).*
24. *Malarkodi, K.P.* Protective effect of lipoic acid on adriamycin induced lipid peroxidation in rat kidney / K.P. Malarkodi, A.N. Balachandar, P. Varalakshmi // *Mol. Cell Biochem., 247 (1–2): 9–13 (2003).*
25. *McCord, J.M.* Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) / J.M. McCord, I. Fridovich // *J. Biol. Chem., 244: 6049–6063 (1969).*
26. *Popper, H.* The estimation of creatinine in serum / H. Popper, F. Mandel, H. Mayer // *Biochem. J., 291: 354 (1937).*
27. *Role of exogenous melatonin in reducing the nephrotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat / P. Dziegiel et al. // J. of Pineal Res., 33 (2): 95–100 (2002).*
28. *Simic, T.* Glutathione and enzymes associated with glutathione metabolism in adriamycin nephropathy / T. Simic, J. Mimic-Oka, M. Sindjic // *Srp. Arh. Celok. Lek., 124 (1): 45–47 (1996).*
29. *Singal, P.K.* Doxorubicin-induced cardiopathy / P.K. Singal, N. Illiskovic // *N. Engl. J. Med. 339: 900–905 (1998).*
30. *The influence of cyclosporin on lipid peroxidation and superoxide dismutase in adriamycin nephropathy in rats / T. Zima et al. // Nephron, 75: 464 (1997).*
31. *Weiss, R.B.* The antracyclines: will we find a better doxorubicin? / R.B. Weiss // *Semin. Oncol. 19: 670–686 (1992).*

and oxydative stress (level of markers and activity of antioxidative enzymes) in rats has been studied in this research. Also amelioration of glycine have compared to melatonin.

Keywords: doxorubicin-induced nephropathy, oxidative stress, glycine, melatonin.

AMELIORATION OF DOXORUBICIN-INDUCED RENAL FUNCTIONAL CHANGES AND OXIDATIVE STRESS BY GLYCINE IN RATS

O.S. Selivanova, S.M. Napalkova

Ulyanovsk State University

Glycine influence on doxorubicin-induced renal functional changes