

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА РАЗВИТИЕ ДОКСОРУБИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПОЧКАХ КРЫС

Ю. В. Саенко, А. М. Шутов, С. М. Напалкова, О. С. Селиванова, Е. Ю. Евстигнеева¹

Исследована возможность фармакологической коррекции эритропоэтином оксидативного стресса, вызванного доксорубицином, в почках крыс. Доксорубицин снижает уровень восстановленного глутатиона и активность глутатион редуктазы в гомогенате почек, что свидетельствует о развитии оксидативного стресса. На содержание белковых карбонильных групп доксорубицин не повлиял. Эритропоэтин уменьшил проявления оксидативного стресса, вызванного доксорубицином, в почках крыс в результате поддержания уровня восстановленного глутатиона и индукции активности ферментов НАД(Ф)Н: хинон оксиредуктазы 1 и глутатион редуктазы.

Ключевые слова: эритропоэтин, доксорубицин, оксидативный стресс, почки

ВВЕДЕНИЕ

Доксорубицин является одним из широко используемых противоопухолевых препаратов и в тоже время одним из наиболее токсичных [3, 6]. Исследования последних лет выявили два основных механизма цитотоксичности доксорубицина в отношении здоровых клеток. Первый механизм связан с его редокс-циклической активностью внутри клетки. Флавиновые редуктазы (цитохром Р-450 редуктаза, цитохром b₅-редуктаза, НАДН-дегидрогеназа, ксантин-оксидаза) способны восстанавливать доксорубицин из формы хинона до семихинона, т.е. осуществлять одновалентное восстановление. В форме семихинона доксорубицин является свободным радикалом и способен восстанавливать кислород до супероксид-анион радикала, окисляясь до исходной хиноидной формы [12].

Цикл одноэлектронного восстановления/окисления доксорубицина может функционировать продолжительное время и вызывать внутриклеточный оксидативный стресс, который приводит к снижению концентрации глутатиона восстановленного (GSH) внутри клетки и, как следствие, к снижению окислительно-восстановительного потенциала [10]. Установлено, что снижение внутриклеточной концентрации GSH может запускать митохондриальный путь реализации апоптоза [14, 16]. В работах последних лет отмечается, что токсический эффект антрациклиновых антибиотиков в отношении нормальных тканей реализуется, в основном, через индукцию апоптоза [3].

Второй механизм цитотоксичности доксорубицина связан с влиянием на обмен железа. Доксорубицин связывается с ионами Fe²⁺, формирование этого комплекса приводит к образованию гидроксильного радикала и инициации цепных реакций с выраженным разветвлением. Антрациклины могут способствовать вы-

свобождению ионов Fe²⁺ из ферритина в результате взаимодействия с этим белком либо опосредованно, через генерацию супероксид-анион радикала и тем самым еще больше усугублять оксидативный стресс [12].

Исходя из этого, мы предположили, что снизить токсичность доксорубицина можно путем введения веществ, способных предотвращать развитие доксорубицин-индуцированного оксидативного стресса.

В ряде работ была продемонстрирована способность эритропоэтина препятствовать развитию оксидативного стресса и запуску программы апоптоза при ряде патологических состояний, таких как инфаркт миокарда [13] и геморрагический шок [1].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния эритропоэтина на доксорубицин-индуцированный оксидативный стресс в почках крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 30 нелинейных белых крысах-самцах массой 220 – 250 г. Животные были разделены на 3 группы: 1 группа — интактные животные (n = 10); 2 группа — животные (n = 10), которым однократно внутрибрюшинно вводили доксорубицин (“Фармсинтез”, Москва) в дозе 7,5 мг/кг; 3 группа — животные (n = 10), которым за 5 мин до инъекции доксорубицина внутривенно вводили эритропоэтин (Эпокрин, ФГУП ГосНИИ ОЧБ, Санкт-Петербург) в дозе 1200 МЕ/кг.

Декапитацию предварительно наркотизированных (тиопентал – натрий, 50 мг/кг внутривенно) животных проводили через 24 ч после введения доксорубицина, для исследования забирали левую почку.

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) в гомогенате ткани почек определяли спектрофотометрически с 1-хлоро-2,4-динитробензолом в качестве субстрата и выражали в мкмоль/мин/мг белка [9]. Активность цитоплазматической НАД(Ф)Н: хинон оксиредуктазы 1 (НХО1) в гомогенате ткани почек определяли методом Фишера с 2,6-дихлорфенолиндофенолом в

¹ Кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии (зав. — С. М. Напалкова) и кафедра терапии и профессиональных болезней (зав. — А. М. Шутов) медицинского факультета Ульяновского государственного университета, Ульяновск, 432700, ул. Л. Толстого, 42.

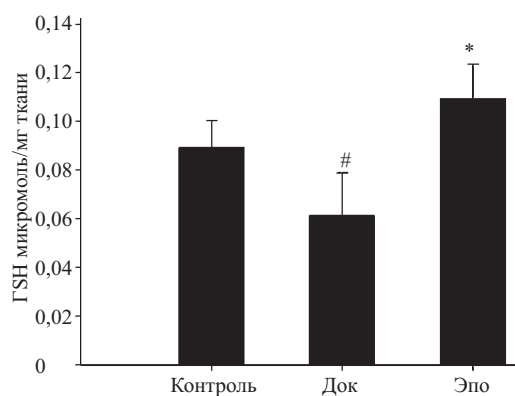


Рис. 1. Влияние доксорубина (Док) и совместного введения доксорубина с эритропоэтином (Эпо), на концентрацию восстановленного глутатиона (ГSH) в гомогенате почечной ткани.

Различия статистически значимы с группой: * — Док, $p < 0,01$, # — контроль, $p < 0,05$.

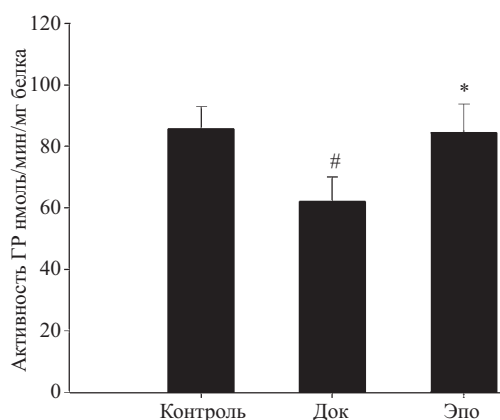


Рис. 2. Влияние доксорубина (Док) и совместного введения доксорубина с эритропоэтином (Эпо) на активность глутатион редуктазы (ГР) в гомогенате почечной ткани.

Различия статистически значимы с группой: * — Док, $p < 0,001$, # — контроль, $p < 0,01$.

качестве субстрата и выражали в мкмоль/мин/мг белка [8]. Активность глутатион редуктазы (ГР) в гомогенате ткани почек определяли спектрофотометрически при $\lambda = 340$ нм и выражали через количество окисленного НАДФН в мкмоль/мин/мг белка [5].

Содержание белковых карбонильных групп в гомогенате ткани почек определяли по методике R. L. Levin и соавт. с 2,4-динитрофенилгидразином и выражали в нмоль/мг белка [11]. Концентрацию глутатиона восстановленного (ГSH) в гомогенате ткани почек определяли в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой и выражали в мкмоль/мг ткани [7]. Концентрацию белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [4].

Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Манна-Уитни. Показатели представлены как $M \pm SD$. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Доксорубин вызвал снижение концентрации ГSH в ткани почек почти на 30% по сравнению с концентрацией у интактных животных. В группе животных, которым перед введением доксорубина вводили эритропоэтин, концентрация ГSH в гомогенате почек статистически не отличалась от концентрации в группе интактных животных, но на 78 % превышала концентрацию у крыс, которым вводили только доксорубин (рис. 1).

Активность ГР в ткани почек животных, которым вводили только доксорубин, составляла $62,1 \pm 8,04$ нмоль/мин/мг белка, что ниже, чем в группе интактных крыс ($85,88 \pm 7,18$ нмоль/мин/мг белка) на 27 % ($p < 0,05$). Введение эритропоэтина предотвращало вызванное доксорубином снижение активности ГР в почечной ткани (рис. 2).

Введение доксорубина не вызывало достоверных изменений активности НХО1 в тканях почек по срав-

нению с интактными животными. При введении эритропоэтина активность НХО1 увеличилась на 108,7 % по сравнению с группой животных, которым вводили только доксорубин ($p < 0,01$), и составила $0,77 \pm 0,176$ мкмоль/мин/мг белка (рис. 3).

Активность GST в гомогенате тканей почек животных всех трех групп статистически не отличалась. У интактных крыс она составляла $0,105 \pm 0,025$ мкмоль/мин/мг белка; в группе животных, которым вводили только доксорубин, $0,118 \pm 0,015$ мкмоль/мин/мг белка и в группе, в которой до введения доксорубина вводили эритропоэтин, $0,122 \pm 0,02$ мкмоль/мин/мг белка ($p > 0,05$).

Не было выявлено достоверных различий в содержании карбонильных групп белковых молекул у крыс, которым вводили препараты, и интактных животных. В почечной ткани интактных животных их содержание составляло $2,13 \pm 1,01$ мкмоль/мг белка; у животных, получавших только доксорубин, $4,21 \pm 2,36$ мкмоль/мг белка; а у крыс, получавших эритропоэтин до введения доксорубина, $2,96 \pm 1,98$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что введение доксорубина привело к снижению концентрации ГSH в паренхиме почки, что согласуется с литературными данными [6]. Введение эритропоэтина предотвращало вызванное доксорубином снижение ГSH в ткани почек, что является благоприятным эффектом, выяснение механизма которого требует дополнительного исследования. Возможно, такой эффект связан с активацией эритропоэтином JAK/STAT сигнальных путей, которые принимают участие в поддержании внутриклеточного редокс-потенциала.

Положительным эффектом эритропоэтина является обнаруженная нами активация НАД(Ф)Н: хинон оксиредуказы 1. Этот фермент защищает клетки от токси-

ческого воздействия веществ хиноидной природы путем осуществления двух-электронного восстановления хинонов до стабильных гидрохинонов. Такая реакция снижает возможность одноэлектронного восстановления доксорубицина до семихинона [2]. Кроме того, НХО1 обладает рядом других защитных функций. Например, поддерживает в восстановленном состоянии коэнзим Q_{10} — один из основных антиоксидантов мембран клеток, и восстанавливает α -токоферол гидрохинон в α -токоферол, участвуя в детоксификации супероксид-анион радикала [15]. Увеличение активности НХО1 положительно отражается на способности клеток противостоять доксорубицин-индуцированному оксидативному стрессу, тогда как снижение активности вызывает повышенную чувствительность к веществам хиноидной природы, к которым относятся все антрациклиновые антибиотики [2, 15].

ВЫВОДЫ

1. Введение доксорубицина через 24 часа приводит к снижению уровня восстановленного глутатиона и активности глутатион редуктазы в гомогенате почек, что свидетельствует о развитии оксидативного стресса.

2. Эритропоэтин уменьшает проявления оксидативного стресса, вызванного доксорубицином, в почках крыс за счет поддержания уровня восстановленного глутатиона и индукции активности ферментов НАД(Ф)Н: хинон оксиредуктазы 1 и глутатион редуктазы.

Исследование поддержано грантом “Университеты России” УР.11.01.029.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. J. Abdelrahman, M. C. Sharples, A. F. McDonald, et al., *Shock*, **22**(1), 63 – 69 (2004).
2. Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, and N. Cenas, *Arch. Biochem. Biophys.*, **404**, 254 – 256 (2002).
3. O. J. Arola, A. Saraste, and K. Pulkki, *Cancer Res.*, **60**, 1789 – 1792 (2000).
4. M. M. Bradford, *Annal. Biochem.*, **72**, 248 – 254.

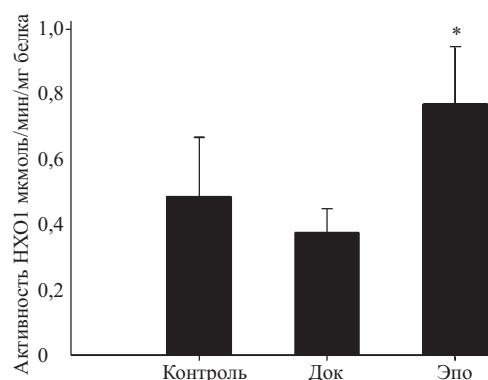


Рис. 3. Влияние доксорубицина (Док) и совместного введения доксорубицина с эритропоэтином (Эпо) на активность НАД(Ф)Н:хинон оксиредуктазы 1 (НХО1) в гомогенате почечной ткани.

Различия статистически значимы с группой Док, * — $p < 0,01$.

5. I. Carlberg and B. Mannervik, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5475 – 5480 (1975).
6. P. Dziegiel, E. Suder, P. Surowiak, et al., *J. Pineal Res.*, **33**, 95 – 100 (2002).
7. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 – 77 (1972).
8. G. R. Fisher and P. L. Gutierrez, *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 359 – 370 (1991).
9. W. G. Habig and M. J. Pabst, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 – 7139 (1974).
10. P. Klatt and S. Lamas, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4928 – 4944 (2000).
11. R. L. Levin, D. Garland, C. N. Oliver, et al., *Methods Enzym.*, **186**, 464 – 478 (1990).
12. G. Minotti, G. Cairo, and E. Monti, *FASEB J.*, **13**, 199 – 212 (1999).
13. C. Parsa, F. Matsumoto, J. Kim, et al., *J. Clin. Invest.*, **112**, 999 – 1007 (2003).
14. Q. F. Schafer and G. R. Buettiner, *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 1191 – 1212 (2001).
15. D. Siegel, D. L. Gustafson, D. L. Dehn, et al., *Mol. Pharmacol.*, **65**, 1238 – 1247 (2004).
16. X. Wang, *Genes Dev.*, **15**, 2922 – 2933 (2001).

Поступила 13.01.05.

THE EFFECT OF ERYTHROPOETIN ON DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RAT KIDNEY

Yu. V. Saenko, A. M. Shutov, S. M. Napalkova, O. S. Selivanova, and E. Yu. Evstigneeva

Department of Medicine, Ul'yanovsk State University, ul. L. Tolstogo 42, Ul'yanovsk, 432700 Russia

The early nephrotoxicity manifestations (oxidative stress) caused by a single administration of doxorubicin in rats and the therapeutic effect of erythropoietin have been studied. The introduction of doxorubicin leads to a decrease in the concentration of glutathione and the activity of glutathione reductase in rat kidneys, which is indicative of the development of oxidative stress. Erythropoietin restores glutathione content on the normal level. The pretreatment with erythropoietin reduces the doxorubicin induced damage in rat kidneys.