

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДОКСОРУБИЦИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

В. А. Кашуро¹, С. И. Глушков¹, Т. М. Новикова¹, В. В. Аксенов²

Представлены экспериментальные данные о воздействии повторных введений доксорубина (2,24 мг/кг) на обмен глутатиона в тканях сердца и эритроцитах белых беспородных крыс. Показана возможность коррекции нарушений естественной системы цитопротекции, возникающей при введении кардиотропного агента, путем использования комбинированного препарата цитофлавина.

Ключевые слова: доксорубин, глутатион, перекисное окисление липидов, цитофлавин

ВВЕДЕНИЕ

Доксорубин (ДР) является эффективным противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда, который как в режиме монотерапии, так и в составе около двадцати пяти программ полихимиотерапии используется для лечения более чем тридцати онко-гематологических заболеваний и солидных опухолей [4].

Кардиотоксичность антрациклинов — один из главных факторов, ограничивающих их применение в клинике. В связи с наличием ярко выраженных кумулятивных эффектов и ростом частоты проявлений кардиотоксического действия при высоких дозах, противоопухолевую активность антрациклиновых антибиотиков невозможно использовать полностью. До сих пор нет однозначного представления о механизмах кардиотоксичности антрациклинов и ДР, в частности. Наиболее широкое распространение получило представление о свободнорадикальном механизме кардиотоксического действия антрациклиновых антибиотиков [1]. При этом наличие взаимосвязи между интенсивностью протекания процессов перекисидации липидов и состоянием системы глутатиона как одной из ведущих антиоксидантных систем клетки, ответственной и за регуляцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), представляет особенный интерес.

Известно, что глутатион принимает непосредственное участие в детоксикации ДР путем конъюгации его метаболитов [5, 6], в защите клетки от повреждающего действия свободных радикалов [8], а также участвует в процессах репарации поврежденных макромолекул.

В связи с этим новые подходы к профилактике и лечению поражения тканей, в первую очередь, миокарда,

в условиях токсического воздействия ДР могут быть основаны на использовании препаратов, нормализующих состояние баланса про- и антиоксидантных систем клетки и тиол-дисульфидного равновесия, индуцирующих активность внутриклеточной системы цитопротекции.

Целью работы явилась оценка кардиопротекторных свойств цитофлавина на основе изучения степени влияния препарата на состояние системы глутатиона и интенсивность ПОЛ в тканях сердца и в эритроцитах животных, получавших доксорубин. Исследование обмена глутатиона в клетках крови проводили для оценки информативности используемых методик в клинической практике.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 180 – 200 г из питомника Рапполово РАМН. Экспериментальную доксорубициновую кардиомиопатию моделировали путем внутривенного струйного введения препарата в дозе 2,24 мг/кг массы животного (в виде 0,2 % водного раствора) с интервалом в 7 сут в течение 4 недель [2]. Введение доксорубина проводили в одну из боковых вен хвоста животного. Хвост непосредственно перед введением помещали в сосуд с горячей водой с целью увеличения кровенаполнения вен.

Для коррекции токсического действия ДР животным внутрибрюшинно 1 раз в сутки ежедневно в течение 28 сут вводили цитофлавин в виде 10 % водного раствора (по янтарной кислоте) в дозе 118 мг/кг (по янтарной кислоте). Животным контрольной группы и отравленным крысам группы сравнения по такой же методике внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (0,5 мл/100 г массы).

Количество животных в каждой группе составляло 10 особей. Выведение животных из эксперимента и за-

¹ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, 194044, ул. Лебедева, 6.

² 442 Окружной военный клинический госпиталь им. З. П. Соловьева, Санкт-Петербург, 191163, Суворовский пр., 63.

бор биологического материала осуществляли после 4-кратного введения ДР.

В гомогенатах тканей сердца и в гемолизате эритроцитов определяли концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ) и малонового диальдегида (МДА). Общую активность глутатионредуктазы (ГР) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ) определяли в гемолизате эритроцитов и в цитозольной фракции, полученной методом дифференциального центрифугирования.

Концентрацию ВГ определяли методом G. L. Elman [10] в модификации, заключающейся в осаждении белка 20 % раствором сульфосалициловой кислоты; содержание МДА — по методу M. Uchiyama [14]. Активность Г-6-Ф-ДГ определяли по методу A. Kornberg [11], а ГР — по I. Carlberg и B. Mannervik [9]. Расчет активности ферментов производили на грамм белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури в модификации G. L. Peterson [12]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel с использованием t-критерия Стьюдента для двух несвязанных величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить, что цитофлавин купирует проявления кумулятивного эффекта повторного введения ДР, связанные с нарушениями обмена глутатиона в тканях сердца и эритроцитах экспериментальных животных (таблица).

Так, в тканях сердца крыс, получавших доксорубин без фармакологической коррекции, отмечалось выраженное снижение ($p < 0,05$) уровня ВГ ниже показателей группы контрольных животных в 2,21 раза, а в эритроцитах — в 1,57 раза (таблица). Использование цитофлавина для лечения животных, получавших химиотерапию, способствовало поддержанию концентрации восстановленной формы трипептида в тканях

сердца на значительно более высоком уровне, который был лишь на 16 % ниже показателей контроля ($p < 0,05$). Кроме того, применение цитофлавина позволяло полностью исключить снижение содержания ВГ в эритроцитах животных, в этих клетках исследуемый ВГ не отличался от значений интактного контроля.

Механизм повышения уровня ВГ в тканях животных при использовании цитофлавина, вероятно, связан с участием входящей в состав препарата янтарной кислоты, способствующей восстановлению антиоксидантов липидной фазы — α -токоферола и убихинона. В этом случае часть приходящейся на ВГ антиоксидантной нагрузки может быть компенсирована за счет этих низкомолекулярных антиоксидантов [3].

Другие составляющие препарата — метионин и инозин также могут участвовать в поддержании на достаточно высоком уровне восстановленной формы трипептида. Метионин является не только наиболее эффективным источником синтеза восстановленного глутатиона *de novo*, но и может выступать в качестве донора восстановленных валентностей и регулятора тиол-дисульфидного равновесия [7]. Инозин, являясь стимулятором белкового синтеза, по-видимому, реализует свое положительное воздействие на обмен глутатиона, активируя синтез ферментов изучаемой системы. Способствуя поддержанию высокой концентрации ВГ в клетках, цитофлавин, несомненно, оказывает сильное воздействие на состояние редокс-статуса клетки в условиях интоксикации ДР, что может явиться одним из ведущих механизмов реализации цитопротекторных свойств препарата.

Повторное введение ДР приводило также к выраженной активации процессов ПОЛ в тканях сердца и эритроцитах лабораторных животных (таблица). Содержание МДА в тканях сердца превышало уровень интактного контроля в 1,72 раза, а в эритроцитах — в

Динамика изменений показателей обмена глутатиона и процессов перекисного окисления липидов в тканях сердца и в эритроцитах экспериментальных животных

Показатель	Группы животных		
	Контроль	ДР	ДР + цитофлавин
<i>Восстановленный глутатион (ммоль/г ткани или мкмоль/г гемоглобина)</i>			
Сердце	3,82 ± 0,11	1,73 ± 0,21*	3,21 ± 0,11*#
Эритроциты	6,33 ± 0,28	4,04 ± 0,49*	7,25 ± 0,50#
<i>Малоновый диальдегид (нмоль/г ткани или нмоль/г гемоглобина)</i>			
Сердце	210,6 ± 9,0	361,3 ± 19,4*	277,5 ± 24,3*#
Эритроциты	42,43 ± 2,92	66,45 ± 5,68*	57,55 ± 6,52
<i>Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (мкмоль/(мин · г белка) или мкмоль/(мин · г гемоглобина))</i>			
Сердце	58,24 ± 5,51	28,27 ± 3,51*	41,76 ± 1,91*#
Эритроциты	6,34 ± 0,28	2,54 ± 0,56*	5,91 ± 0,66#
<i>Глутатионредуктаза (мкмоль/(мин · г белка) или мкмоль/(мин · г гемоглобина))</i>			
Сердце	96,80 ± 6,13	69,79 ± 4,51*	82,69 ± 4,15
Эритроциты	303,2 ± 27,3	150,7 ± 20,1*	279,5 ± 35,7#

Примечание. Отличия достоверны при сравнении: * — $p < 0,05$ с группой контроля; # — $p < 0,05$ с группой отравленных животных без коррекции.

1,57 раза ($p < 0,05$). Применение цитофлавина способствовало полному (эритроциты) или частичному (сердце) предотвращению активации ПОЛ в тканях экспериментальных животных, получавших химиотерапию. Концентрация МДА в эритроцитах крыс этой группы не отличалась от значений контроля, а в тканях сердца была на 23,2 % ($p < 0,05$) ниже показателей особей, не получавших лечения.

В связи с тем что использование цитофлавина в условиях повторного введения ДР позволило существенно снизить интенсивность процессов ПОЛ, препарат может оказывать стабилизирующее воздействие на состояние мембран кардиомиоцитов и, следовательно, повысить эффективность выполнения ряда мембранных функций этими клетками.

Применение цитофлавина позволило исключить в тканях отравленных животных угнетение активности ферментов, принимающих участие в восстановлении глутатиона — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы (таблица).

Возможными причинами угнетения активности ключевого фермента пентозофосфатного шунта в условиях воздействия ДР могут стать повреждения молекул фермента свободными радикалами, образующимися в результате метаболизма цитостатика [1, 4], а также нарушения тиол-дисульфидного статуса клетки [8, 13]. Так, повторное введение ДР приводило к достоверному ($p < 0,05$) снижению глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности в тканях сердца в 2,06 раза и в 2,5 раза в эритроцитах животных. Применение цитофлавина позволило сохранить активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах на уровне интактного контроля и повысить ее активность в тканях сердца на 47,7 % по сравнению с животными, получавшими только ДР ($p < 0,05$).

Для изменений глутатионредуктазной активности в исследуемых тканях экспериментальных животных была характерна сходная динамика (таблица). В тканях сердца активность ГР при введении ДР снижалась в 1,39 раза, а в эритроцитах — в 2,01 раза ($p < 0,05$). У отравленных животных, получавших цитофлавин, активность ГР в тканях сердца и в эритроцитах сохранялась на уровне интактного контроля.

Причинами стимулирующего действия цитофлавина на активность ферментов редокс-циклирования глутатиона в условиях токсического воздействия доксорубина могут явиться: восстановление уровня ВГ под влиянием сукцината и, особенно, метионина; положительное влияние сукцината и метионина на состояние редокс-статуса клетки и на активность SH-зависимых ферментов; индуцирующее влияние инозина на белковый синтез, в том числе на синтез ферментов системы глутатиона.

Выводы

ВЫВОДЫ

1. Цитофлавин оказывает существенное кардиопротекторное действие благодаря повышению концентрации восстановленного глутатиона, снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов с повышением активности тиолзависимых ферментов.

2. Под действием цитофлавина повышается активность ферментов, принимающих участие в восстановлении глутатиона из окисленной формы, а также восстанавливается редокс-статус в клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Л. Гершанович, *Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей*, Медицина, Москва (1982).
2. С. И. Глушков, С. А. Куценко, Т. М. Новикова и др., *Вопр. онкол.*, **51**(1), 108 – 112 (2005).
3. М. В. Кения, А. И. Лукаш, Е. П. Гуськов, *Усп. соврем. биологии*, **113**, Вып. 4, 456 – 470 (1993).
4. Д. В. Корман, *Основы противоопухолевой химиотерапии*, Москва (2006).
5. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Усп. соврем. биологии*, **110**, Вып. 1(4), 20 – 37 (1990).
6. Г. В. Смирнова, О. Н. Октябрьский, *Биохимия*, **70**(11), 1459 – 1473 (2005).
7. В. В. Соколовский, *Вопр. мед. химии*, № 6, 2 – 11 (1988).
8. Л. А. Тиунов, *Вестн. РАМН*, № 3, 9 – 13 (1995).
9. I. Carlberg and B. Mannervik, *Meth. Enzymol.*, **113**, 484 – 490 (1985).
10. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**(1), 70 – 77 (1959).
11. A. Kornberg, B. L. Horecker, and P. Z. Smyrniot, *Meth. Enzymol.*, **1**, 323 – 327 (1955).
12. G. L. Peterson, *Anal. Biochem.*, **83**(2), 346 – 356 (1977).
13. D. J. Reed, *Biochem. Pharmacol.*, **35**(1), 7 – 13 (1986).
14. M. Uchiyama and M. Michara, *Anal. Biochem.*, **86**(1), 271 – 278 (1978).

Поступила 03.11.09

CARDIOPROTECTOR EFFECT OF CYTOFLAVINE ON A MODEL OF DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY

V. A. Kashuro¹, S. I. Glushkov¹, T. M. Novikova¹, and V. V. Aksenov²

¹ Department of Pharmacology, St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia

² Military District Clinical Hospital No. 442, Suvorovskii prosp. 63, St. Petersburg, 191163, Russia

Experimental data on the influence of repeated administration of doxorubicin in a dose of 2.24 mg/kg on the glutathione exchange in heart tissues and erythrocytes of white outbred rats are presented. It was shown that disorders in the natural cytoprotection system caused by the introduction of this cardiotoxic agent, can be corrected using a combined preparation of cytoflavin.

Key words: Doxorubicin, glutathione, lipid peroxidation, cytoflavin