

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА И 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СЕРДЦА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Сипров А.В., ¹Костина Ю.А.

¹ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия (430005, Саранск, ул. Большевистская, 68), e-mail: alek-s13@mail.ru

Проведен анализ изменения показателей ферментативного и неферментативного антиоксидантных звеньев в тканях сердца крыс с карциномой WALKER-256 и морфологических изменений в сердце под влиянием производных пиридина и 3-гидроксипиридина – ксимедона и мексидола, в сравнении с кардиоксаном при химиотерапии доxorубицином и паклитакселом. Исследование проводилось на 100 крысах линии Wistar массой 150-250 г. Доксорубин (4 мг/кг) и паклитаксел (6 мг/кг) вводили внутривентрально однократно. Ксимедон и мексидол вводили внутримышечно в дозах 100 и 50 мг/кг соответственно, кардиоксан – внутривентрально в дозе 80 мг/кг за 20 минут до введения цитостатиков. Установлено, что на 14-е сутки эксперимента мексидол и кардиоксан, в отличие от ксимедона, в сопоставимой степени повышают защитный потенциал ферментативного и неферментативного антиоксидантных звеньев в сердце. Сочетанное применение ксимедона и мексидола повышает защитный потенциал неферментативного антиоксидантного звена и препятствует развитию негативных морфологических изменений в сердце более эффективно, чем использование их по отдельности или кардиоксана.

Ключевые слова: доxorубин, паклитаксел, ксимедон, мексидол, антиоксидантная защита, кардиомиоциты.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF PYRIMIDINE AND 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVES INFLUENCE ON THE HEART ANTIOXIDANT PROTECTION AND CARDIOTOXICITY MORPHOLOGIC MANIFESTATIONS OF ANTITUMOR CHEMOTHERAPY IN EXPERIMENT

¹Siprova V., ¹Kostina Y.A.

¹Mordovia State University n.a. N.P. Ogarev, Saransk, Russia (430005, Saransk, Bolshevistskaya str., 68), e-mail: alek-s13@mail.ru

We have analysed changes of enzymatic and non-enzymatic antioxidant links in cardiac tissues of rats with Walker-256 carcinoma and morphological changes in the heart at the influence of pyrimidine and 3-hydroxypyridine derivatives – xymedon and mexidol, in comparison with kardioxane at the chemotherapy with doxorubicin and paclitaxel. The study has been carried out in 100 female Wistar rats, weighing 150-250 g. Doxorubicin (4 mg/kg) and paclitaxel (6 mg/kg) were administered intraperitoneally once. Xymedon (100 mg/kg) and mexidol (50 mg/kg) were administered intramuscularly. Kardioxan (80 mg/kg) was administered intraperitoneally 20 min before the administration of cytostatics. Mexidol and kardioxane comparable increase protective potential of enzymatic and non-enzymatic antioxidant links in the heart more efficiently than xymedon on the 14th day of the experiment. The combination of xymedon and mexidol increases protective potential of non-enzymatic antioxidant link and protects the appearance of negative morphological changes in the heart more efficiently than separate use of these medicines or use of kardioxane.

Keywords: doxorubicin, paclitaxel, xymedon, mexidol, antioxidant protection, cardiomyocytes.

Введение

Из противоопухолевых средств антрациклиновые антибиотики обладают наиболее выраженной кардиотоксичностью, связанной во многом с генерацией свободных радикалов. В настоящее время лекарственные режимы, используемые в лечении злокачественных опухолей, становятся все более сложными, с комбинацией различных антибластомных агентов, например, антрациклинов и таксанов, проявляющих синергизм в отношении

развития кардиотоксических эффектов [8, 9]. Для снижения кардиотоксичности антрациклинов применяют дексразоксан (кардиоксан), однако до сих пор для него не определены четкие показания и схемы назначения [7]. Американское общество клинической онкологии не одобряет регулярного использования дексразоксана при химиотерапии антрациклинами, за исключением ситуаций, когда их кумулятивная доза приближается к 300 мг/м² или превышает ее [8]. Существенным фактором, сдерживающим применение кардиоксана, является его высокая стоимость.

В условиях злокачественного опухолевого процесса и химиотерапии развивающаяся анемия может усугубить гипоксическое повреждение кардиомиоцитов. Использование методов локальной гипотермии зоны ишемии миокарда повышает ее устойчивость к гипоксии, предотвращая повреждение клеток [5]. В связи с техническими сложностями таких методов широкое распространение в коррекции гипоксических повреждений получило использование антигипоксантов и антиоксидантов.

В эксперименте показано, что производные 3-гидроксипиридина обладают кардиопротекторным действием при развитии доксорубицин-индуцированной кардиотоксичности [4]. Производное пиримидина – ксимедон – обладает антиоксидантным и апоптозрегулирующим действием, противоишемической активностью [2]. Вместе с тем кардиопротекторные свойства ксимедона остаются малоизученными.

Цель исследования – сравнительное изучение влияния производных пиримидина и 3-гидроксипиридина – ксимедона и мексидола, а также их комбинации (в сравнении с кардиоксаном) – на активность антиоксидантных ферментов, содержание тиоловых групп в тканях сердца и морфологические проявления кардиотоксичности доксорубицина и паклитаксела у крыс с карциномой Walker-256.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на 100 крысах-самках линии Wistar массой 150-250 г разводки питомника НЦБМТ РАМН «Столбовая». Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария Мордовского государственного университета при естественном световом режиме на стандартной диете, свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Суспензию клеток карциномы WALKER-256 (W-256) (10⁶ клеток в растворе Хенкса) перевивали под кожу хвоста. Животные были распределены на 7 групп. Дизайн исследований представлен в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Дизайн исследований

Группы животных	Режим эксперимента
Интактные животные (n=7)	Опухолевые клетки W-256 не вводили, лекарственная терапия не проводилась
1-я – опухолевый штамм W-256 (контроль) (n=12)	1·10 ⁶ опухолевых клеток W-256 под кожу хвоста
2-я – W-256, Доксорубин – W-256+ДР (n=12)	1·10 ⁶ опухолевых клеток W-256, доксорубин внутривнутрибрюшинно в дозе 4 мг/кг на 11-е сутки после имплантации опухолевых клеток
3-я – W-256, Доксорубин, Паклитаксел – W-256+ДР+ПТ (n=14)	1·10 ⁶ опухолевых клеток W-256, доксорубин в дозе 4 мг/кг и паклитаксел в дозе 6 мг/кг внутривнутрибрюшинно на 11-е сутки после имплантации опухолевых клеток
4-я – W-256, Доксорубин, Паклитаксел, Ксимедон 100 мг/кг – W-256+ДР+ПТ+Ксимедон (n=14)	Так же, как и в 3-й группе, ксимедон внутримышечно в дозе 100 мг/кг ежедневно, начиная с 11-х суток эксперимента, 10 суток
5-я – W-256, Доксорубин, Паклитаксел, Мексидол 50 мг/кг – W-256+ДР+ПТ+Мексидол (n=14)	Так же, как и в 3-й группе, мексидол внутримышечно в дозе 50 мг/кг ежедневно, начиная с 11-х суток эксперимента, 10 суток
6-я – W-256, Доксорубин, Паклитаксел, Кардиоксан 80 мг/кг – W-256+ДР+ПТ+Кардиоксан (n=14)	Так же, как и в 3-й группе, кардиоксан внутривнутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг за 20 мин до введения цитостатиков, на 11-е сутки опыта
7-я – W-256, Доксорубин, Паклитаксел, Мексидол 50 мг/кг, Ксимедон 100 мг/кг – W-256+ДР+ПТ+Мексидол+Ксимедон (n=14)	Так же, как и в 3-й группе, мексидол в дозе 50 мг/кг и ксимедон в дозе 100 мг/кг внутримышечно, начиная с 11-х суток эксперимента, 10 суток

Исследование проводили на 14-е и 22-е сутки эксперимента. Для этого по 6-7 животных из каждой группы в указанные сроки выводили из опыта под общей анестезией тиопенталом натрия. Для оценки изменений в антиоксидантной системе в гомогенатах сердца определяли активность каталазы [3], супероксиддисмутазы (СОД) [1], содержание общих, белковых и небелковых SH-групп [6]. Гистологическую структуру сердца исследовали на 22-е сутки эксперимента светооптическим методом с предварительной фиксацией кусочков органа в 10% растворе нейтрального формалина и окраской парафиновых срезов гематоксилином и эозином. При статистической обработке результатов исследования определяли показатели средних арифметических значений (M), стандартных ошибок средних арифметических (m). Нормальность распределения проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова. При условии соответствия нормальности распределения достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с использованием критерия Стьюдента. При несоответствии нормальности распределения достоверность различий оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При оценке состояния антиоксидантных ферментов выявлено, что в 1-ой группе (контрольной) активность каталазы снижалась лишь к 22-м суткам на 31,2% по сравнению с интактными животными (с $8,3 \pm 0,6$ до $5,71 \pm 0,57$

мккат/л ($p < 0,05$), а активность СОД повышалась на 52,5% и 92,5% ($p < 0,01$) на 14-е и 22-е сутки соответственно (с $0,4 \pm 0,01$ до $0,61 \pm 0,06$ и $0,77 \pm 0,03$ у.е./г ткани).

Во 2-ой и 3-ей группах активность каталазы достоверно снижалась уже на 14-е сутки на 36% и 44% соответственно по отношению к интактным животным. Активность СОД при этом не изменялась. Подобные изменения могут свидетельствовать о депрессии ферментативного звена антиоксидантной системы и создании предпосылок для преобладания процессов пероксидации и накопления в сердце прооксидантов. В 5, 6, 7-й группах отмечались адаптивные изменения активности указанных ферментов. Так, активность каталазы достоверно повышалась на 47,8%, 26% и 25% соответственно по отношению к 3-ей группе. Это сопровождалось ростом активности СОД на 15% в 5-ой группе и 25% в группах 6 и 7 ($p < 0,05$), по сравнению с интактными животными. На 22-е сутки активность каталазы во всех экспериментальных группах была ниже, чем у интактных животных, и не отличалась от таковой в 3-ей группе (ДР+ПТ). Активность СОД в 3-ей группе повышалась на 57,5% ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным. В условиях дефицита каталазы высокая активность СОД может служить причиной развития деструктивных процессов. В 4, 5, 6 и 7-й группах активность СОД повышалась умеренно – на 17,5%, 10%, 15% и 27,5% соответственно по сравнению с интактными крысами, и была достоверно ниже, чем в 3-ей группе. Это может быть связано с уменьшением образования субстрата (кислородных радикалов) для СОД.

Содержание общих тиоловых групп в тканях сердца в контрольной группе снижалось как на 14-е, так и на 22-е сутки на 41,5% и 48% соответственно ($p < 0,001$) по отношению к интактным животным (за счет небелковых фракций, табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Содержание SH-групп в тканях сердца крыс с карциномой W-256 при введении ксимедона и мексидола на фоне химиотерапии доксорубицином и паклитакселом, ($M \pm m$)

Группы животных / Сроки исследования		Показатель		
		SH-группы общие, мкмоль/мл	SH-группы белковые, мкмоль/мл	SH-группы небелковые, мкмоль/мл
Интактные		33,71±2,3	19,14±2,3	14,57±0,61
1 – W-256 (контроль)	14-е сутки	19,71±1,2 $p_1 < 0,001$	14,85±1,3	4,86±0,6 $p_1 < 0,001$
	22-е сутки	17,5±1,2 $p_1 < 0,001$	13,25±1,9	4,25±0,95 $p_1 < 0,001$
2 – W-256+ДР	14-е сутки	25,4±1,3 $p_{1,2} < 0,05$	15,2±1,3	10,2±0,37 $p_{1,2} < 0,001$
	22-е сутки	28,2±2,5 $p_2 < 0,05$	17,7±1,3	10,5±1,82 $p_{1,2} < 0,05$
3 – W-256+ДР+ПТ	14-е сутки	21,29±2,3	9,86±1,6	11,43±1,25

		$p_1 < 0,01$	$p_{1,2,3} < 0,05$	$p_{1,2} < 0,05$
	22-е сутки	$18,43 \pm 1,5$ $p_{1,3} < 0,01$	$12,57 \pm 1,5$ $p_{1,3} < 0,05$	$5,86 \pm 2,15^*$ $p_1 < 0,01$
4 – W-256+ДР+ПТ+ксимедон	14-е сутки	$23,5 \pm 1,3$ $p_1 < 0,01$	$18,0 \pm 1,9$ $p_4 < 0,01$	$5,5 \pm 0,92$ $p_{1,3,4} < 0,01$
	22-е сутки	$20,5 \pm 0,9$ $p_{1,3} < 0,05$	$15,33 \pm 0,95$	$5,17 \pm 1,0$ $p_{1,3} < 0,05$
5 – W-256+ДР+ПТ+мексидол	14-е сутки	$27,17 \pm 1,1$ $p_{1,2} < 0,05$	$19,17 \pm 1,05$ $p_{2,3,4} < 0,05$	$8,0 \pm 0,68$ $p_{1,2,3,4} < 0,05$
	22-е сутки	$26,5 \pm 0,67$ $p_{1,2,4,5} < 0,05$	$15,33 \pm 0,84^*$	$11,17 \pm 0,94^*$ $p_{1,2,5} < 0,01$
6 – W-256+ДР+ПТ+кардиооксан	14-е сутки	$30,66 \pm 0,8$ $p_{2-6} < 0,05$	$21,33 \pm 2,2$ $p_{2,3,4} < 0,05$	$9,33 \pm 1,4$ $p_{1,2,5} < 0,05$
	22-е сутки	$21,5 \pm 0,7^*$ $p_{1,2,3,6} < 0,05$	$17,5 \pm 0,62$ $p_{2,4} < 0,05$	$4,0 \pm 0,77^*$ $p_{1,3,6} < 0,001$
7 – W-256+ДР+ПТ+ксимедон+мексидол	14-е сутки	$31,3 \pm 1,99$ $p_{2-5} < 0,05$	$15,83 \pm 1,5$ $p_4 < 0,05$	$15,5 \pm 1,2$ $p_{2-7} < 0,05$
	22-е сутки	$30,33 \pm 1,3$ $p_{2,4,5,6,7} < 0,01$	$20,17 \pm 0,83$ $p_{2,4,5,6,7} < 0,05$	$10,16 \pm 0,65^*$ $p_{1,2,5,7} < 0,01$

Примечание: p_1 – достоверность различий рассчитана по отношению к интактным животным; p_2 – к группе 1; p_3 – к группе 2; p_4 – к группе 3; p_5 – к группе 4; p_6 – к группе 5; p_7 – к группе 6; * – статистически значимые различия в группе на 22-е сутки по отношению к 14-м суткам, $p < 0,05$.

Во 2-ой группе уровень общих SH-групп также снижался за счет небелковых фракций, при этом содержание последних превышало таковое в контрольной группе в 2 и 2,5 раза на 14-е и 22-е сутки соответственно. Подобные изменения на фоне химиотерапии доксорубицином могут быть отражением уменьшения общих нарушений гомеостаза и эндогенной интоксикации, сопровождающих опухолевую прогрессию, в связи с реализацией противоопухолевого эффекта цитостатика. В 3-ей группе содержание общих SH-групп достоверно снижалось на 14-е и 22-е сутки за счет белковых (на 48,5% и 34,3% соответственно) и небелковых фракций (на 21,5% и 60% соответственно по отношению к интактным крысам, табл. 2), что может свидетельствовать об усилении процессов окисления тиоловых групп и снижении защитного потенциала неферментативного звена антиоксидантной системы.

В 4-ой и 5-ой группах содержание общих тиолов снижалось за счет небелковых SH-групп, при этом уровень белковых тиолов не отличался от такового у интактных животных. В 6-ой группе на 14-е сутки эксперимента содержание общих и белковых SH-групп увеличивалось в 1,44 и 2,2 раза соответственно по отношению к 3-ей группе ($p < 0,05$), однако к 22-м суткам наблюдалась отрицательная динамика: уровень общих SH-групп не отличался от такового в 3-ей группе за счет прогрессирующего снижения содержания небелковых тиолов (табл. 2). В 7-ой группе концентрация общих SH-групп достоверно превышала

таковую в 3-ей группе как на 14-е, так и 22-е сутки наблюдения – в 1,5 и 1,6 раза соответственно, не отличаясь от показателя интактных животных. Содержание белковых тиолов также не отличалось от такового у интактных крыс. Уровень небелковых SH-групп на 14-е сутки превышал таковой в 3-ей группе в 1,36 раза ($p < 0,05$), не отличаясь от исходного показателя, однако к 22-м суткам снижался на 30% по отношению к интактным крысам.

При гистологическом исследовании сердца выявлено, что у животных 1-ой группы мышечные волокна местами истончены и перерастянуты. Ядра кардиомиоцитов несколько увеличены в размерах по сравнению с животными интактной группы и окружены участками неоднородной, зернистой саркоплазмы. Межмышечная соединительная ткань умеренно отечная. У крыс во 2-ой группе мышечные волокна неоднородны, местами истончены и перерастянуты, местами – утолщены, поперечно-полосатая исчерченность в основном сохранена. Ядра кардиомиоцитов увеличены в размерах по сравнению с животными 1-ой группы и окружены участками неоднородной, зернистой саркоплазмы. Встречались единичные, мелкие очаги фрагментации мышечных волокон, явления периваскулярного кардиосклероза.

В миокарде животных 3-ей группы, по сравнению со 2-ой, местами субэндокардиально отмечался слабовыраженный гиалиноз стенок артериол. Мышечные волокна неоднородные, с нечеткими границами, бесструктурные. Ядра кардиомиоцитов деформированы, с неровными контурами и разными размерами. Отмечались явления кариопикноза, в меньшей степени – кариорексиса. Саркоплазма с явлениями набухания, частичного расплавления, местами оптически пустая. Встречались множественные крупные очаги фрагментации мышечных волокон, явления периваскулярного кардиосклероза. Межмышечная соединительная ткань умеренно отечная.

У животных в 4-ой и 5-ой группах мышечные волокна с сохраненной структурой, несколько утолщены за счет набухания саркоплазмы, поперечно-полосатая исчерченность в основном сохранена, местами слабо выражена. Ядра кардиомиоцитов средних размеров. Явлений кариопикноза и кариорексиса, фрагментации мышечных волокон не отмечалось. Саркоплазма с явлениями некоторого набухания и слабой зернистостью. Местами – умеренный отек межмышечной соединительной ткани.

В 6-ой группе мышечные волокна с сохраненной структурой, местами истончены и перерастянуты, в отдельных участках с явлениями миоцитолита. Явления кариопикноза и кариорексиса отсутствовали. Саркоплазма со слабой зернистостью, в отдельных участках с явлениями расплавления. Встречались единичные, мелкие очаги фрагментации мышечных волокон. Межмышечная соединительная ткань местами умеренно отечная. Отмечались явления слабого периваскулярного кардиосклероза.

У животных 7-ой группы мышечные волокна не изменены, местами несколько утолщены, поперечно-полосатая исчерченность сохранена. Явлений кариопикноза и кариорексиса, фрагментации мышечных волокон, отека межмышечной соединительной ткани не отмечалось. Явления кардиосклероза отсутствовали.

Заключение. Таким образом, мексидол и кардиоксан в сопоставимой степени повышают защитный потенциал ферментативного и неферментативного (тиолового) антиоксидантных звеньев в сердце на 14-е сутки эксперимента. Однако на 22-е сутки опыта только в группе с ксимедоном отмечается тенденция к формированию более выгодного баланса между активностью каталазы и супероксиддисмутазы, а мексидол эффективнее ксимедона и кардиоксана корригирует состояние неферментативного звена антиоксидантной защиты сердца, увеличивая восстановительный потенциал клетки. Сочетанное применение ксимедона и мексидола повышает защитный потенциал неферментативного антиоксидантного звена и препятствует развитию негативных морфологических изменений в сердце более эффективно, чем использование их по отдельности или кардиоксана.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. - №10. – С. 30-33.
2. Кадыров Р.К. Влияние ксимедона на деструктивные изменения в поджелудочной железе, вызванные ишемией // Вестник современной клинической медицины. – 2012. – Т.5, №3. – С.15-18.
3. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, А.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. - №1. – С. 16-18.
4. Сипров А.В. Перспективы использования производных 3-оксипиридина как средств, обеспечивающих протекторный эффект против кардиотоксичности антрациклинов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2006. - №1. – С. 58-64.
5. Ураков А.Л. Холод в аситу сердца. Наука в СССР. – 1987. - №2. – С. 63-65.
6. Фаломеев В.Ф. Фотоколориметрический ультрамикрометод количественного определения сульфгидрильных групп белка и небелковых соединений // Лаб. дело. – 1981. - № 1. – С. 33.
7. Фандеев О.А., Васечкин С.С., Алехин М.Н. Клиническое значение кардиотоксичности антрациклинов: современные подходы к диагностике, профилактике и лечению // Кардиология. – 2011.- №7. – С. 40-46.

8. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies/ Y.Octavia, C.G.Tocchetti, K.L. Gabrielson[etal.]// Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2012. – Vol.52. – P. 1213-1225.
9. Strategiestopreventandtreatcardiovascularriskincancerpatients / D. Cardinale, G. Bacchiani, M. Beggiato[etal.] // Seminarsinoncology. – 2013. – Vol. 40, №2. – P. 186-198.

Рецензенты:

Моисеева И.Я., д.м.н., профессор, зав. кафедрой «Общая и клиническая фармакология», Медицинский институт, ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», г. Пенза.

Блинов Д.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общественного здоровья, организации здравоохранения и фармации с курсом гигиены, Медицинский институт, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск.