

## **ВЛИЯНИЕ СРЕДСТВ С АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА СТРУКТУРНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ГЕМОГЛОБИНА ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ АНТИБЛАСТОМНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Масягин В.А.<sup>1</sup>, Сипров А.В.<sup>1</sup>, Тютяев Е.В.<sup>1</sup>**

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

Изучена эффективность применения средств с антиоксидантным действием – мексидола и ксимедона – в коррекции структурного и функционального статуса гемоглобина у крыс с карциномой WALKER-256 при комбинированной химиотерапии доxorубицином и доцетакселом. Исследование проводилось на 35 крысах-самках линии Wistar массой 150-250 г. Доксорубицин (4 мг/кг) и доцетаксел (11,5 мг/кг) вводили внутривентриально однократно. Ксимедон и мексидол вводили внутримышечно в дозах 100 и 50 мг/кг соответственно. Установлено, что мексидол эффективнее ксимедона корригирует структурное и функциональное состояние гемоглобина и повышает его кислородтранспортную функцию. Однако эти позитивные изменения проявляются только в ранние сроки после введения цитостатиков (на 14-е сутки эксперимента).

Ключевые слова: доxorубицин, доцетаксел, ксимедон, мексидол, гемоглобин.

## **THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANT MEDICINES ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL HEMOGLOBIN STATUS AT THE COMBINED ANTINEOPLASTIC CHEMOTHERAPY IN EXPERIMENT**

**Masyagin V.A.<sup>1</sup>, Siprov A.V.<sup>1</sup>, Tyutyayev E.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia (430005, Saransk, Bolshevistskaya str., 68), e-mail: [alek-s13@mail.ru](mailto:alek-s13@mail.ru)

The efficiency of antioxidant medicines (mexidol and xymedon) in correction of structural and functional hemoglobin status in rats with Walker-256 carcinoma at the combined chemotherapy with doxorubicin and docetaxel has been studied. The study was carried out in 35 female Wistar rats, weighing 150-250 g. Doxorubicin (4 mg/kg) and docetaxel (11,5 mg/kg) were administered intraperitoneally once. Xymedon (100 mg/kg) and mexidol (50 mg/kg) were administered intramuscularly. It has established, that mexidol corrects structural and functional hemoglobin state and increases its oxygen transport function more effectively than xymedon. However these positive changes occur only in the early stages after cytostatics administration (on the 14<sup>th</sup> day of experiment).

Keywords: doxorubicin, docetaxel, xymedon, mexidol, hemoglobin.

Гематотоксические осложнения занимают лидирующую позицию в ряду побочных эффектов противоопухолевой химиотерапии. Уменьшение или предупреждение гематотоксичности основано на применении в качестве гематопротекторов витаминов, нуклеиновых кислот, цитокинов [3] с ограниченным успехом. Изучение гематопротекторных свойств антиоксидантов разных классов основано на патогенетической значимости активации свободнорадикальных процессов в развитии гематотоксических реакций. При этом интенсификация перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов и плазме крови с последующим развитием функциональной неполноценности клеток красной крови в сочетании с анемией ведут к усилению гипоксии, усугубляя течение основного патологического процесса [1]. Ранее показано миелопротекторное действие мексидола и

эмоксипина при использовании алкилирующих цитостатиков, доксорубицина и этопозиды в эксперименте [6, 7]. Не исключено, что в реализации гематопротекторного действия определенную роль играет прямое действие мексидола на митохондриальные процессы в эритроидных клетках, где происходит синтез гемоглобина [2]. Производное пириимидина ксимедон, обладающий антиоксидантными свойствами, эффективнее мексидола уменьшает степень тяжести анемии у животных при химиотерапии доксорубицином и паклитакселом [8].

Вместе с тем, снижение эффективности переноса кислорода эритроцитами может быть связано и с изменениями свойств гемоглобина, определяющих его сродство к кислороду и распределение в клетке [4], что вносит свой вклад в усиление гипоксии. Влияние средств, обладающих антиоксидантным действием – мексидола и ксимедона – на структурный и функциональный статус гемоглобина при проведении антибластомной химиотерапии до сих пор не изучено.

**Цель исследования** – оценить изменения молекулярного состояния гемоглобина у крыс с карциномой Walker-256 при введении ксимедона и мексидола при комбинированной химиотерапии доцетакселом и доксорубицином.

**Материал и методы исследования.** Эксперименты выполнены на 35 крысах-самках линии Wistar массой 150-250 г. 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) ( $10^6$  клеток в растворе Хенкса) перевивали под кожу хвоста. Животные были распределены на 5 групп. Дизайн исследований представлен в табл. 1.

Таблица 1

Дизайн исследований

Группы	Режим эксперимента
Интактные животные (n=7)	Опухолевые клетки W-256 не вводили, лекарственная терапия не проводилась
1-я – опухолевый штамм W-256 (контроль) (n=7)	$1 \cdot 10^6$ опухолевых клеток W-256 под кожу хвоста
2-я – W-256, Доксорубицин, Доцетаксел – W-256+ДР+ДТ (n=7)	$1 \cdot 10^6$ опухолевых клеток W-256, доксорубицин в дозе 4 мг/кг и доцетаксел в дозе 11,5 мг/кг внутрибрюшинно на 11-е сутки после имплантации опухолевых клеток
3-я – W-256, Доксорубицин,	Так же, как и во 2-й группе, ксимедон

Доцетаксел, Ксимедон 100 мг/кг – W-256+ДР+ДТ+Ксимедон (n=7)	внутримышечно в дозе 100 мг/кг ежедневно, начиная с 11-х суток эксперимента, 10 суток
4-я – W-256, Доксорубин, Доцетаксел, Мексидол 50 мг/кг – W-256+ДР+ДТ+Мексидол (n=7)	Так же, как и во 2-й группе, мексидол внутримышечно в дозе 50 мг/кг ежедневно, начиная с 11-х суток эксперимента, 10 суток

У 6-7 животных из каждой группы на 14-е и 22-е сутки эксперимента проводили забор крови кардиальной пункцией под общей анестезией тиопенталом-натрия (50 мг/кг), кровь гепаринизировали, затем готовили мазок на предметном стекле. Исследование выполнялось с помощью рамановского спектрометра *in via Basis*, для получения спектров гемопорфирина гемоглобина использовался микроскоп с регистрацией комбинационного рассеяния света *in via Basis* фирмы Renishaw с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм), длина волны излучения используемого лазера составляла 532 нм, мощность излучения 100 мВт, объектив 50×. Регистратор данных – CCD детектор (1024×256 пикселей с пельтье-охлаждением до -70°C) с решеткой 1800 штр/мм. Оцифрованные спектры обрабатывались в программе WIRE 3.3. Производилась коррекция базовой линии, сглаживание спектров. Наличие полос в РАМАН-спектре при исследовании конформации и свойств гемоглобина отражает структурное и функциональное состояние гемоглобина и позволяет на молекулярном уровне оценить его потенциальные возможности. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) позволяет исследовать состояние атома железа и лигандов, связанных с ним, по изменению структуры тетрапиррольного цикла гемопорфирина гемоглобина. Для анализа конформации и O<sub>2</sub>-связывающих свойств гемоглобина использовали следующие полосы КР спектров эритроцитов (указаны положения максимумов): 1172, 1355, 1375, 1548-1552, 1580-1588, 1618, 1668 см<sup>-1</sup>[5].

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 t-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.** Полученные данные продемонстрировали, что содержание оксигемоглобина в эритроцитах у животных 1-ой группы (контрольной) на 14-е сутки эксперимента достоверно снижалось на 6% на фоне роста доли комплексов гемоглобина с NO при отсутствии связи между атомом Fe<sup>2+</sup> и

глобином (на 61%,  $p < 0,01$ ) и числа комплексов гемоглобина с NO при наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином (на 25%,  $p < 0,01$ ) по сравнению с интактными крысами (табл. 2).

Таблица 2

РАМАН-спектроскопия гемоглобина эритроцитов у крыс с карциномой W-256 при введении ксимедона и мексидола на фоне химиотерапии доксорубицином и доцетакселом (14-е сутки эксперимента), ( $M \pm m$ )

Показатель	Экспериментальные группы				
	Интактные	1 – W-256 контроль	2 – W-256+ ДР+ДТ	3 – W-256+ ДР+ДТ+ ксимедон	4 – W-256+ ДР+ДТ+ мексидол
Доля оксигемоглобина в эритроцитах (I1375/(I1355+I1375))	0,66±0,006	0,62±0,01 $p_1 < 0,001$	0,57±0,01 $p_{1,2} < 0,01$	0,55±0,004 $p_{1,2} < 0,001$	0,61±0,007 $p_{1,3,4} < 0,001$
Способность гемоглобина связывать лиганды (I1355/I1550)	0,62±0,01	0,67±0,03	0,88±0,03 $p_{1,2} < 0,001$	0,86±0,01 $p_{1,2} < 0,001$	0,67±0,01 $p_{1,3,4} < 0,05$
Способность гемоглобина выделять лиганды (I1375/I1580)	0,66±0,01	0,67±0,02	0,78±0,01 $p_{1,2} < 0,001$	0,8±0,01 $p_{1,2,3} < 0,05$	0,67±0,01 $p_{3,4} < 0,001$
Сродство гемоглобина к кислороду (I1355/I1550)/(I1375/I1580)	0,95±0,02	1,0±0,03	1,15±0,04 $p_{1,2} < 0,05$	1,04±0,02 $p_{1,3} < 0,05$	1,0±0,02 $p_3 < 0,01$
Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец (I1375/I1172)	1,4±0,03	1,3±0,05	0,97±0,04 $p_{1,2} < 0,001$	1,1±0,03 $p_{1,2,3} < 0,05$	1,2±0,04 $p_{1,2,3} < 0,05$
Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии связи между атомом $Fe^{2+}$ и глобином (I1668/I1580)	0,18±0,008	0,29±0,04 $p_1 < 0,01$	0,26±0,01 $p_1 < 0,001$	0,5±0,01 $p_{1,2,3} < 0,001$	0,2±0,007 $p_{1,2,3,4} < 0,05$
Доля комплексов гемоглобина с NO при наличии связи между атомом $Fe^{2+}$ и глобином (I1618/I1580)	0,4±0,007	0,5±0,03 $p_1 < 0,01$	0,5±0,01 $p_1 < 0,001$	0,7±0,01 $p_{1,2} < 0,001$	0,46±0,007 $p_{1,3,4} < 0,01$

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.

Известно, что сродство NO к атому  $Fe^{2+}$  гема выше, чем кислорода, поэтому NO способен конкурировать с кислородом за связывание гемоглобином.

Химиотерапия доксорубицином с доцетакселом (во 2-ой группе животных) сопровождалась ухудшением кислородтранспортной функции гемоглобина, что проявлялось снижением содержания оксигемоглобина в эритроцитах на 13,6% ( $p < 0,01$ ) в сочетании с достоверным ростом доли комплексов гемоглобина с NO при отсутствии и наличии связи

между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином на 44% и 25% соответственно по отношению к интактным животным. Данные изменения сопровождались статистически значимым увеличением сродства гемоглобина к кислороду на 21%, что может уменьшать поступление кислорода к тканям, а также способности гемоглобина связывать и выделять лиганды (на 42 и 18% соответственно) в сравнении с интактными крысами (табл. 2). Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец достоверно уменьшалась по сравнению с интактными животными, что свидетельствует об определенных конформационных изменениях молекулы гемоглобина.

Дополнительное введение ксимедона на фоне терапии доксорубицином и доцетакселом (в 3-й группе) проявлялось схожими изменениями: доля оксигемоглобина, способность гемоглобина связывать лиганды не отличались от таковых во 2-ой группе животных. Сродство гемоглобина к кислороду при этом снижалось на 9,5%, что облегчает отдачу кислорода в тканях, а способность гемоглобина выделять лиганды увеличивалась на 2,5% по сравнению с животными 2-ой группы ( $p < 0,05$ , табл. 2). Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец приближалась к соответствующему показателю у интактных крыс, однако также оставалась достоверно меньше. Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии и наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином возрастала в 2,7 и 1,75 раза соответственно в сравнении с интактными животными ( $p < 0,001$ ). Следует отметить, что комплекс гемоглобина с NO при отсутствии связи между белком и гемопорфирином регулирует способность гемоглобина отдавать кислород.

В 4-й группе животных (с введением мексидола на фоне терапии доксорубицином и доцетакселом) доля оксигемоглобина в эритроцитах возрастала на 7% по отношению ко 2-й группе (без введения мексидола), нормализовывались способность гемоглобина выделять лиганды и сродство гемоглобина к кислороду. Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец сохранялась меньшей, чем у интактных животных, однако отмечалась тенденция к нормализации и этого показателя (достоверно увеличивался на 23% по отношению к животным 2-й группы). Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии и наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином достоверно снижалась по сравнению с животными, получавшими только доксорубицин и доцетаксел, на 23% и 8% соответственно (табл. 2).

К 22-м суткам эксперимента у животных контрольной группы доля оксигемоглобина в эритроцитах снижалась на 24% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными, что является закономерным в связи с развитием анемии. При этом способность гемоглобина связывать и выделять лиганды достоверно повышалась на 45% и 21% на фоне роста сродства

гемоглобина к кислороду на 15,8% по отношению к интактным крысам. Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии связи между атомом Fe<sup>2+</sup> и глобином в 3 раза превышала соответствующий показатель у интактных животных, а содержание комплексов гемоглобина с NO при наличии связи между атомом Fe<sup>2+</sup> и глобином – в 1,8 раза (p<0,001) (табл. 3.).

Таблица 3

РАМАН-спектроскопия гемоглобина эритроцитов у крыс с карциномой W-256 при введении ксимедона и мексидола на фоне химиотерапии доксорубицином и доцетакселом (22-е сутки эксперимента), (M±m)

Показатель	Экспериментальные группы				
	Интактные	1 – W-256 контроль	2 – W-256+ ДР+ДТ	3 – W-256+ ДР+ДТ+ ксимедон	4 – W-256+ ДР+ДТ+ мексидол
Доля оксигемоглобина в эритроцитах (I1375/(I1355+I1375))	0,66±0,006	0,5±0,005 p <sub>1</sub> <0,001	0,59±0,01 p <sub>1,2</sub> <0,001	0,53±0,007 p <sub>1,3</sub> <0,001	0,56±0,009 p <sub>1,2,3,4</sub> <0,05
Способность гемоглобина связывать лиганды (I1355/I1550)	0,62±0,01	0,9±0,01 p <sub>1</sub> <0,001	0,73±0,02 p <sub>1,2</sub> <0,001	0,9±0,03 p <sub>1,3</sub> <0,001	0,8±0,02 p <sub>1,2,3,4</sub> <0,05
Способность гемоглобина выделять лиганды (I1375/I1580)	0,66±0,01	0,8±0,01 p <sub>1</sub> <0,001	0,68±0,01 p <sub>2</sub> <0,001	0,8±0,01 p <sub>1,3</sub> <0,001	0,68±0,009 p <sub>2,4</sub> <0,001
Сродство гемоглобина к кислороду (I1355/I1550)/(I1375/I1580)	0,95±0,02	1,1±0,02 p <sub>1</sub> <0,001	1,05±0,05	1,1±0,04 p <sub>1</sub> <0,001	1,13±0,03 p <sub>1</sub> <0,01
Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец (I1375/I1172)	1,4±0,03	0,9±0,03 p <sub>1</sub> <0,001	1,07±0,05 p <sub>1,2</sub> <0,05	1,02±0,03 p <sub>1</sub> <0,001	0,94±0,05 p <sub>1</sub> <0,05
Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии связи между атомом Fe <sup>2+</sup> и глобином (I1668/I1580)	0,18±0,008	0,55±0,02 p <sub>1</sub> <0,001	0,2±0,01 p <sub>2</sub> <0,001	0,58±0,01 p <sub>1,3</sub> <0,001	0,19±0,007 p <sub>2,4</sub> <0,001
Доля комплексов гемоглобина с NO при наличии связи между атомом Fe <sup>2+</sup> и глобином (I1618/I1580)	0,4±0,007	0,7±0,02 p <sub>1</sub> <0,001	0,5±0,02 p <sub>1,2</sub> <0,01	0,7±0,02 p <sub>1,3</sub> <0,001	0,46±0,005 p <sub>1,2,4</sub> <0,001

Примечание: p<sub>1</sub> – достоверность различий рассчитана по отношению к интактным животным; p<sub>2</sub> – к группе 1; p<sub>3</sub> – к группе 2; p<sub>4</sub> – к группе 3.

Во 2-й группе (с использованием только доксорубицина и доцетаксела) содержание оксигемоглобина на 22-е сутки эксперимента снижалось по сравнению с интактными крысами на 11% , способность гемоглобина связывать лиганды достоверно возрастала по отношению к интактным животным, а сродство к кислороду и способность выделять

лиганды – нормализовывались. Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец на 23% уменьшалась по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ). Доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином не отличалась от таковой у интактных крыс, а содержание комплексов гемоглобина с NO при наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином в 1,25 раза превышала исходный уровень ( $p < 0,01$ , табл. 3).

В 3-й группе животных (с ксимедоном) содержание оксигемоглобина в эритроцитах, способность гемоглобина связывать и выделять лиганды, сродство к кислороду, выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец и доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии и наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином не отличались от уровня соответствующих показателей контрольных животных.

В 4-й группе животных (с мексидолом) доля оксигемоглобина в эритроцитах оставалась ниже исходного показателя на 15%. Способность гемоглобина связывать лиганды достоверно превышала таковую во 2-й группе на 9,5%, а выделять лиганды – не отличалась от исходного показателя. Сродство гемоглобина к кислороду и выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец не отличались от таковых в контрольной группе, а доля комплексов гемоглобина с NO при отсутствии и наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином не отличались от уровня соответствующих показателей во 2-й группе животных (табл. 3).

**Заключение.** Таким образом, мексидол эффективнее ксимедона корректирует ассоциированные с введением доксорубина и доцетаксела изменения молекулярной структуры гемоглобина, что повышает его кислородтранспортную функцию и проявляется увеличением количества оксигемоглобина, нормализацией сродства гемоглобина к кислороду и способности выделять лиганды, уменьшением содержания в эритроцитах комплексов гемоглобина с NO. Временный характер этих изменений может быть обусловлен влиянием опухолевого процесса.

### Список литературы

1. Девяткин А.А., Ревин В.В., Юданов М.А. Выброс клеточного ядра из эритроцитов голубя и состояние мембранных липидов при воздействии пероксидом водорода // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т.141. – №2. – С. 225-228.
2. Девяткина Т.А., Важничная Е.М., Олейник Н.А. Регуляторное действие мексидола на уровень гемоглобина при остром стрессе // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70. – №5. – С. 24-26.

3. Джабаров Ф.Р., Розенко Л.Я., Гуськова Н.К. Возможности гематопротекторного действия дикарбамина при химиолучевом лечении злокачественных опухолей // Вопросы онкологии. – 2012. – Т.58. – №4. – С. 572-577.
4. Изменения состояния гемоглобина у больных ишемической болезнью сердца и больных с недостаточностью кровообращения / А.И. Юсипович, Н.А. Браже, О.Г. Лунева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155. – №2. – С. 201-203.
5. Нанобиотехнологии: практикум / А.М. Абатурова [и др.]; под ред. А.Б. Рубина. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 348 с.
6. Сипров А.В., Микуляк Н.И., Кинзирская Ю.А. Антиоксиданты как средства снижения гематотоксичности химио- и лучевой терапии злокачественных опухолей // Пенза: Изд-во ПГУ, 2012. – 298 с.
7. Скопин П.И. Производные 3-оксипиридина оптимизируют применение этопозида на модели карциномы легких Льюис / П.И. Скопин, А.В. Зорькина, Ю.А. Скопина, О.В. Минаева // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №6. – С. 272.
8. Сравнительная оценка гематопротекторной эффективности производных пиридина и 3-гидроксипиридина при противоопухолевой химиотерапии в эксперименте / В.А. Масягин, А.В. Сипров, Н.Д. Волкова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №3. URL: <http://www.science-education.ru/123-19818> (дата обращения: 22.06.2015).

**Рецензенты:**

Зорькина А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой поликлинической терапии и функциональной диагностики с курсом эндокринологии, Медицинский институт, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск;

Скопин П.И., д.м.н., доцент кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики и лучевой терапии, Медицинский институт, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск.