

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ ЯИЧНИКОВ КРЫС С КАРЦИНОМОЙ WALKER-256 ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА И 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА В СОЧЕТАНИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ И ПАКЛИТАКСЕЛОМ

Сипрова М.В.¹, Сипров А.В.¹, Вашуркина И.М.¹, Макарова М.Ю.¹, Шмырева Н.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: alek-s13@mail.ru

Произведен анализ изменений параметров липидной пероксидации и в системе глутатиона яичниковой ткани крыс с карциномой Walker-256 под действием дериватов пиримидина и 3-гидроксипиридина – ксимедона и мексидола, а также их комбинации при антибластной химиотерапии с использованием схемы «доксорубин + паклитаксел». Исследование проводили на 87 линейных самках-крысах Wistar весом 150-250 г. Доксорубин (4 мг/кг) и паклитаксел (6 мг/кг) вводили однократно внутривентрально. Раздельное и комбинированное использование ксимедона (100 мг/кг) и мексидола (50 мг/кг) осуществляли внутримышечно в течение 10 дней, начиная с момента введения цитостатиков. Нами установлено, что на протяжении всего исследования (на 14-й и 22-й дни опытов) ксимедон уступал мексидолу в препятствии росту концентрации малонового диальдегида и оснований Шиффа и развитию оптимального баланса в системе глутатиона (с увеличением концентрации не только восстановленной изоформы глутатиона и активности глутатионоредуктазы, но также и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) в тканях яичников. Комбинированное введение ксимедона и мексидола не обнаружило преимуществ сравнительно с раздельным использованием препаратов в коррекции содержания продуктов липопероксидации в яичниках, однако более эффективно способствовало увеличению резерва восстановленного глутатиона.

Ключевые слова: ксимедон, мексидол, полихимиотерапия, липопероксидация, глутатион, яичники.

CHANGES OF LIPID PEROXIDATION AND GLUTATHIONE SYSTEM IN OVARIAN TISSUES OF RATS WITH WALKER-256 CARCINOMA IN USE OF PYRIMIDINE AND 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVES WITH DOXORUBICIN AND PACLITAXEL

Siprova M.V.¹, Siprov A.V.¹, Vashurkina I.M.¹, Makarova M.Y.¹, Shmyreva N.V.¹

¹N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: alek-s13@mail.ru

We have analysed change of lipid peroxidation and glutathione system parameters in ovarian tissue of rats with Walker-256 carcinoma at the affection of pyrimidine and 3-hydroxypyridine derivatives – xymedon and mexidol and their combination at the antineoplastic chemotherapy with doxorubicin and paclitaxel using. The study was carried out in 87 Wistar rats with a weight of 150-250 g. Doxorubicin (4 mg/kg) and paclitaxel (6 mg/kg) were administered at once intraperitoneally. Separated and combined using of xymedon (100 mg/kg) and mexidol (50 mg/kg) were carried out intramuscularly during 10 days, starting with day of cytostatics administration. We have established that xymedon conceded to mexidol in prevention of the increase of main lipid peroxidation products concentration (malonic dialdehyde and Schiff's bases) and glutathione system optimal balance development (with increase of reduced glutathione concentration and glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity) in ovarian tissues in our investigation. Combined using of ximedon and mexidol didn't reveal advantages comparing separated use of medications in correction of lipid peroxidation products content in ovaries but promoted the increase of reduced glutathione reserve more effectively.

Keywords: xymedon, mexidol, polychemotherapy, lipid peroxidation, glutathione, ovaries.

Успехи в современной онкологии позволили достигнуть значимых результатов в лечении рака молочной железы. Полихимиотерапия как компонент лечения обладает гонадотоксичным действием и зачастую ведет к снижению фертильности [1; 2]. Большинство больных с начальными стадиями заболевания имеют относительно благоприятный прогноз и удлиненные сроки выживаемости. Возрастает доля пациенток

репродуктивного возраста, которые перенесли онкологическое заболевание и имеют желание продолжать полноценную жизнь. Поэтому поиск особо оптимальных, безопасных и эффективных методов сохранения и восстановления репродуктивной функции у онкобольных остается на сегодняшний день актуальной задачей. Известно, что в токсических осложнениях применения противоопухолевых средств важные роли принадлежат реакциям свободнорадикального окисления, приводящим к оксидативной модификации белков и липидов [3-5]. Регуляцию меняющейся в этом случае в окислительную сторону интрацеллюлярной среды выполняют разные редокс-буферы, наиважнейшим из которых является система глутатиона, принимающая участие в утилизации активных форм кислорода и перекисных соединений. Следовательно, внутриклеточный уровень восстановленной изоформы глутатиона и ферментов, участвующих в его обмене, является маркером активности оксидативных процессов и, таким образом, устойчивости самой клетки к токсическому повреждению [6]. Ксимедон обладает широким спектром терапевтического действия, в том числе регенераторным, антиоксидантным, апоптозрегулирующим и антиишемическим эффектами [7]. Мексидол также обладает широким спектром терапевтического действия, и прежде всего антиоксидантным и антиишемическим. Ранее показано, что мексидол не уменьшает эффективность противоопухолевой терапии, а ксимедон даже способствует потенцированию антибластомного эффекта комбинации «доксорубицин + паклитаксел» в эксперименте [4; 5; 8]. Однако проявления овариопротекторных свойств ксимедона и мексидола, а также их комбинации при антибластомной химиотерапии остаются неизученными.

Цель исследования – оценка изменений в перекисидации липидов (ПОЛ) и системе глутатиона яичниковой ткани крыс с карциномой Walker-256 под действием дериватов пиримидина и 3-гидроксипиримидина – ксимедона и мексидола при антибластомной химиотерапии с использованием схемы «доксорубицин + паклитаксел».

Материал и методы исследования. Исследования выполнялись на 87 самках-крысах линии Вистар весом 150-250 граммов, полученных из питомника НЦБМТ «Столбовая». Подопытных крыс содержали в стандартизированных условиях вивария Мордовского государственного университета с использованием естественного светового режима и стандартной диеты, при свободном доступе к воде и пище. Все процедуры с животными выполнялись согласно правилам «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» (Guide for the care and use of laboratory animals) [9]. Взвесь клеток опухоли Walker-256 (W-256) (1 млн клеток в готовом растворе Хэнкса) вводили подкожно в область хвоста. Было выделено 6 групп животных. Дизайн эксперимента представлен в табл. 1.

Таблица 1

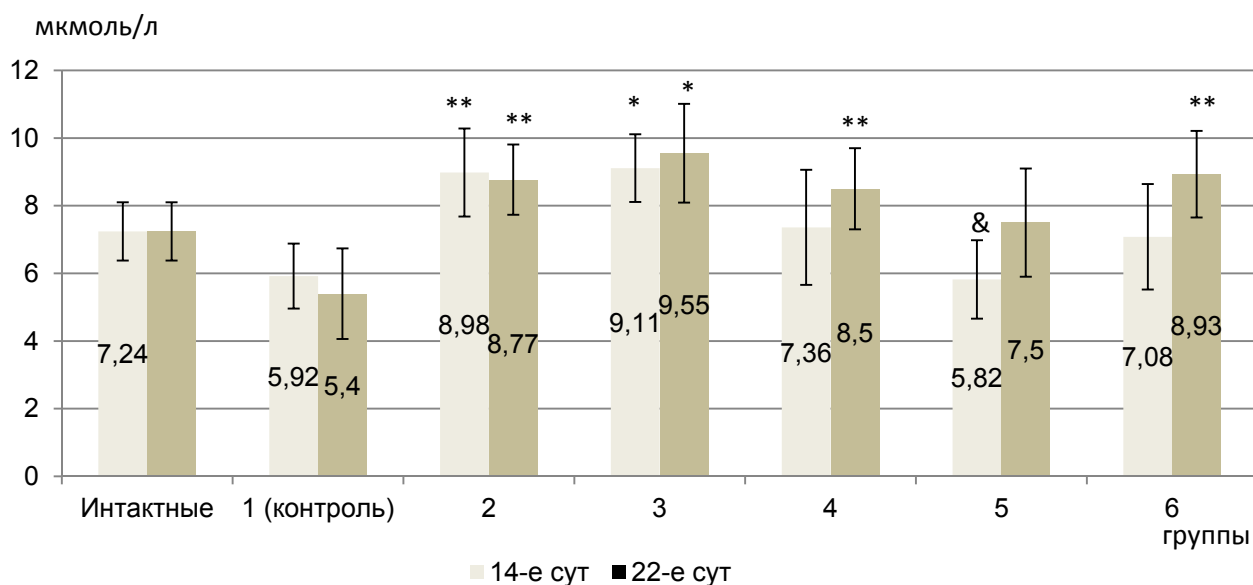
Дизайн эксперимента

Группы крыс	Режим исследования
интактные крысы (n=7)	клетки опухоли W-256 не вводились и лекарственную терапию не проводили
1-я – животные с опухолевым штаммом W-256 (контроль) (n=12)	1 млн клеток штамма W-256 инъецировали под кожу в область хвоста
2-я – животные с W-256 с лечением доксорубицином – W-256+Д (n=12)	1 млн клеток штамма W-256, доксорубицин в дозировке 4 мг/кг внутривенно однократно на 11-е сутки от момента введения опухоли
3-я – животные с W-256 с лечением доксорубицином и паклитакселом – W-256+Д+П (n=14)	1 млн клеток штамма W-256, доксорубицин и паклитаксел в дозировках 4 и 6 мг/кг соответственно, внутривенно однократно на 11-е сутки от момента введения опухоли
4-я – животные с W-256 с лечением доксорубицином, паклитакселом, ксимедоном – W-256+Д+П+К (n=14)	химиотерапия по аналогии с 3-й группой, ксимедон в дозировке 100 мг/кг ежедневно внутримышечно 10 дней, начиная с 11-х суток опыта
5-я – животные с W-256 с лечением доксорубицином, паклитакселом, мексидолом – W-256+Д+П+М (n=14)	химиотерапия по аналогии с 3-й группой, мексидол в дозировке 50 мг/кг ежедневно внутримышечно 10 дней, начиная с 11-х суток опыта
6-я – животные с W-256 с лечением доксорубицином, паклитакселом, мексидолом, ксимедоном – W-256+Д+П+М+К (n=14)	химиотерапия по аналогии с 3-й группой, мексидол и ксимедон в дозировках 50 и 100 мг/кг соответственно, ежедневно внутримышечно 10 дней, начиная с 11-х суток опыта

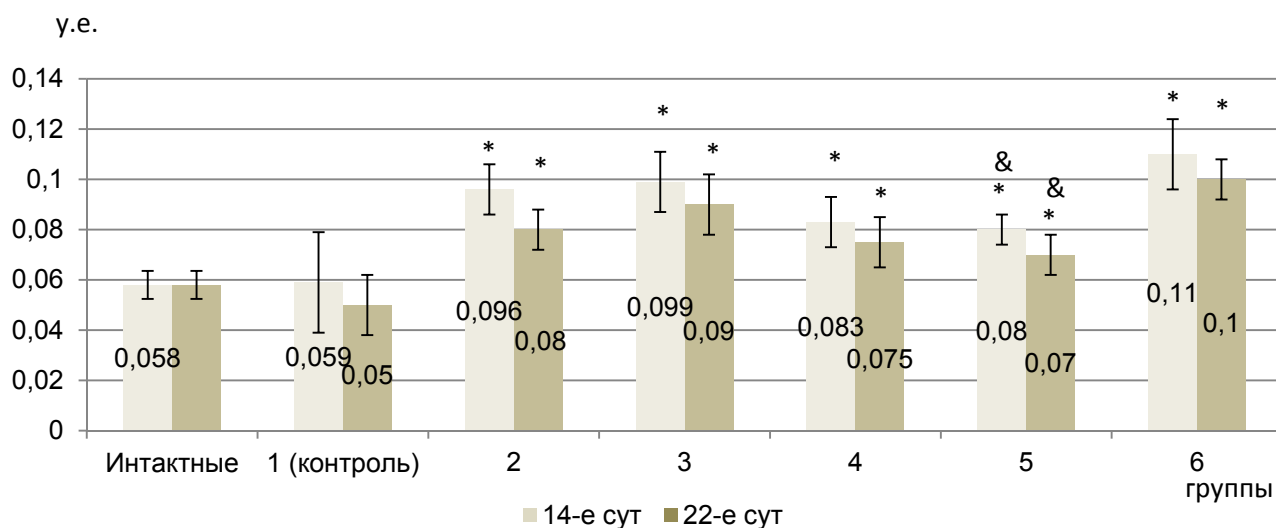
Субстанцию ксимедона производства ФГУП НИИ «Кристалл» (Россия) использовали в дозировке 100 мг/кг (6% от LD₅₀) в виде 10% раствора на изотоническом растворе хлористого натрия, официальную лекарственную форму мексидола («Фармасофт», Россия) – в дозировке 50 мг/кг (6% от LD₅₀) в виде 5% раствора. Следовательно, использованные дозы явились изотоксичными [10; 11]. Исследуемые параметры оценивали на 14-й и 22-й дни эксперимента. С этой целью 6-7 крыс в каждой из групп в указанное время подвергали эвтаназии с применением общей анестезии (тиопентал натрия). Оценку изменений в процессах ПОЛ в гомогенате яичников проводили спектрофотометрическим методом по содержанию диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК), оснований Шиффа (ОШ) [12],

уровня малонового диальдегида (МДА) (в реакции с тиобарбитуровой кислотой с применением соответствующих реактивов («Агат-Мед», Москва)); оценку изменений в системе глутатиона проводили по концентрации восстановленной изоформы глутатиона (ВИГ) [13], активности глутатионоредуктазы (ГР) [14], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) (с применением реактивов фирмы Sentinel, Италия). В процессе статистического анализа полученных результатов вычисляли показатели значений средних арифметических (М), а также стандартных ошибок при вычислении средних арифметических (m). Нормальность распределения устанавливали при помощи теста Колмогорова-Смирнова. В случае соответствия нормальности распределения достоверность выявленных различий сравниваемых величин оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. В случае несоответствия данному критерию достоверность выявленных отличий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными, если $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Показатели ДК и ТК в целом не претерпевали достоверных изменений в динамике липопероксидации при оценке цитостатической овариотоксичности и ее снижении при введении ксимедона и мексидола. На 14-й день эксперимента во 2-й экспериментальной группе (с химиотерапией Д) уровень МДА не различался с таковым у интактных животных, но превышал показатель в контроле на 51,7%. При этом содержание ОШ достоверно превышало исходный уровень интактных крыс на 65,5% (рис.) и на 62,7% - относительно контроля. В 3-й группе (при терапии Д+П) был отмечен достоверный рост концентраций МДА и ОШ на 25,8% и 70,7% соответственно в отношении интактных крыс, и на 53,9% и 67,8% по сравнению с контролем (рисунок).



А. Концентрация МДА



Б. Содержание ОШ

*- достоверные различия в сравнении с интактной группой ($p < 0,05$);

** - достоверные различия в сравнении с группой 1 (контроль) ($p < 0,05$);

&- достоверные различия в сравнении с группой 3 ($p < 0,05$).

Содержание продуктов пероксидации липидов в яичниках крыс с карциномой W-256 под воздействием ксимедона и мексидола при антибластной химиотерапии по схеме «доксорубицин + паклитаксел» (А-Б)

В 4-й группе (с дополнительным введением ксимедона) уровень МДА был таким же, как у интактных крыс, однако содержание ОШ достоверно превышало исходный показатель на 43% (рис.). В 5-й группе (с дополнительным введением мексидола) отмечалось достоверное падение концентрации МДА на 36% по отношению к 3-й группе при отсутствии различий с исходом. Содержание ОШ также достоверно снижалось на 19,2% по сравнению с 3-й группой. При этом по сравнению с интактными крысами уровень ОШ превышал на 37,9%. У крыс 6-й группы (при сочетании ксимедона и мексидола) отмечалось повышение концентрации ОШ на 89,6% относительно интактных крыс (рис.). При этом уровень МДА не отличался от исходного показателя.

На 22-й день исследований во 2-й экспериментальной группе отмечали повышение уровня ОШ на 37,9% по сравнению с интактными животными (рис.). При этом в сравнении с 14-ми сутками содержание ОШ снижалось на 16,7%. В 3-й группе концентрация МДА и ОШ превышала соответствующие показатели у интактных животных на 31,9% и 55% соответственно, что не отличалось от 14-х суток опыта. В 4-й группе уровень МДА не отличался от исходного показателя, а содержание ОШ достоверно превышало таковое в интактной группе на 29,3%. В 5-й группе концентрация МДА не отличалась от исходного

показателя, а содержание ОШ не только превышало таковое в интактной группе на 20,7%, но и достоверно снижалось в сравнении с 3-й группой на 22,2% (рис.). У крыс 6-й группы содержание МДА не различалось с исходным параметром, а ОШ – увеличивалось на 72,4% в сравнении с интактными крысами, не отличаясь от показателя на 14-е сутки опыта. Таким образом, мексидол в отличие от ксимедона способствовал более эффективному торможению накопления продуктов липопероксидации в яичниках, так как достоверно ограничивал рост уровня не только МДА, но и ОШ в сравнении с группой 3 в течение всего исследования.

Концентрация ВИГ в контрольной группе на 14-е сутки эксперимента снижалась на 30,2% на фоне падения активности ГР на 65,9% относительно интактных животных (табл. 2). Во 2-й группе отмечалось лишь снижение активности ГФДГ на 25,2% относительно интактных крыс. В 3-й группе концентрация ВИГ снижалась на 26,6% относительно интактных животных в комбинации со снижением активностей ГР и ГФДГ на 72,3% и 29,13% соответственно. В 5-й и 6-й группах уровень ВИГ достоверно повышался на 20,97% и 14,5% соответственно по отношению к 3-й группе, однако не достигал исходного уровня. При этом в 5-й группе увеличивалась активность ГР в 2 раза относительно 3-й группы, оставаясь ниже исхода, а ГФДГ – на 39,8% (до исходного уровня). В 6-й группе более значимо повышалась только активность ГР – в 3 раза относительно 3-й группы, активность ГФДГ была на 35,1% ниже интактного параметра и не отличалась от уровня 3-й группы. В 4-й группе концентрация ВИГ не отличалась от показателя в 3-й группе и была ниже исхода на 16%. При этом активность ГР возрастала на 92,3% по отношению к 3-й группе, оставаясь ниже исхода, а активность ГФДГ возрастала на 34,3%, достигая исходного уровня (табл. 2).

Таблица 2

Изменение показателей восстановленной изоформы глутатиона, активности глутатионоредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы яичниковой ткани крыс с карциномой W-256 под действием ксимедона и мексидола при антибластомной химиотерапии по схеме «доксорубин + паклитаксел» ($M \pm m$)

Показатель / Сроки исследования		Группы животных						
		Интактные	1	2	3	4	5	6
ВИГ, ммоль/г ткани	14-е сутки	1,69± 0,05	1,18± 0,1*	1,47± 0,09	1,24± 0,06*	1,42± 0,05*	1,5± 0,06*&	1,42± 0,03*&
	22-е сутки	1,69± 0,05	1,2± 0,07*	1,3± 0,1*	1,07± 0,02*▼	1,42± 0,04*&	1,3± 0,05*&▼	1,84± 0,08&#▼
ГР, ммоль/ сутки	14-е сутки	0,047± 0,005	0,016± 0,002*	0,048± 0,006**	0,013± 0,004*	0,025± 0,001*&	0,026± 0,002*&	0,04± 0,003***&

мин-г	22-е	0,047±	0,0128±	0,026±	0,018±	0,027±	0,025±	0,028±
ткани	сутки	0,005	0,002*	0,004*	0,002*	0,003*&	0,002*&	0,003*&▼
ГФДГ, мЕ/г ткани	14-е	3,33±	3,11±	2,49±	2,36±	3,17±	3,3±	2,16±
	сутки	0,16	0,15	0,15*	0,2*	0,25&	0,18&	0,15*#
	22-е	3,33±	2,22±	2,15±	2,1±	2,87±	3,03±	3,03±
	сутки	0,16	0,26*	0,24*	0,3*	0,23	0,17&	0,2&▼

Примечания:

*- достоверная разница в сравнении с интактными крысами ($p < 0,05$);

** - достоверная разница в сравнении с группой 1 (контроль) ($p < 0,05$);

&- достоверная разница в сравнении с группой 3 ($p < 0,05$);

#- достоверная разница в сравнении с группами 4 и 5 ($p < 0,05$);

▼ - достоверная разница в группе в сравнении с 14-ми суткам ($p < 0,05$).

К 22-му дню исследований в контрольной группе отмечали понижение активности ГФДГ на 33,3% относительно интактных животных, при этом показатели ВИГ и ГР, как на 14-е сутки, оставались ниже исходных значений. Во 2-й группе концентрация ВИГ достоверно снижалась на 23% по отношению к интактным животным, а активности ГР и ГФДГ – на 44,7% и 35,4% соответственно (табл. 2). В 3-й группе отмечалось прогрессирующее снижение уровня ВГ – на 13,7% относительно 14-х суток и 36,7% ниже исходного у интактных животных. Активности ГР и ГФДГ были ниже, чем у интактных крыс, на 61,7% и 36,9% соответственно. В 4-й и 5-й группах концентрация ВИГ достоверно возрастала на 32,7% и 21,5% соответственно, активность ГР достоверно увеличивалась на 50% и 38,9% соответственно относительно 3-й группы, оставаясь ниже исходных показателей. При этом в группе с мексидолом уровень ВИГ был ниже такового на 14-е сутки эксперимента на 13,3%. Активность ГФДГ в 4-й и 5-й группах не отличалась от исхода, а в группе с мексидолом на 44% достоверно превышала соответствующий показатель в 3-й группе (табл. 2). Наиболее эффективно концентрация ВИГ возрастала в 6-й группе – на 71,9% относительно 3-й группы, достигая исходного значения. При этом в сравнении с 14-ми сутками прирост составил 29,6%. Активность ГФДГ увеличивалась на 44,3% по сравнению с 3-й группой, прирост относительно 14-х суток составил 40,3%, достигая уровня интактных животных. Активность ГР увеличивалась на 55,5% по сравнению с 3-й группой, оставаясь при этом ниже исходного показателя. В сравнении с 14-ми сутками активность ГР снизилась на 30%. Следовательно, ксимедон, мексидол и их сочетание уменьшают выраженность функциональной недостаточности глутатионовой системы в яичниковой ткани, повышая ее потенциальные антиоксидантные возможности в условиях антибластомной химиотерапии.

Заключение. Таким образом, препарат мексидол обеспечивал наиболее эффективное торможение активации процессов липопероксидации с развитием наиболее оптимального

баланса в системе глутатиона на 14-й день исследования. При последующем наблюдении (на 22-й день опыта) мексидол также эффективнее ксимедона уменьшал содержание продуктов перекисидации липидов в тканях яичников (снижалось содержание как МДА, так и оснований Шиффа, по сравнению с группой крыс с полихимиотерапией) и поддерживал оптимальный баланс в системе глутатиона. Комбинированное введение ксимедона и мексидола не обнаружило преимуществ сравнительно с отдельным использованием этих препаратов в коррекции содержания продуктов перекисидации липидов в тканях яичников, несмотря на более эффективное восстановление содержания восстановленного глутатиона.

Список литературы

1. Шарипова Н.Ю. Возможности сохранения репродуктивной функции у женщин, больных раком молочной железы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2013. – 28 с.
2. Abir R., Ben-Aharon I., Garor R. et al. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in pediatric female cancer patients before and after cancer therapy // Human Reproduction. - 2016. - Vol. 31. - № 4. - P. 750-762.
3. Минаева Л.В. Экспериментальная оценка роли изменений системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2007. – 20 с.
4. Сипров А.В. Сравнительная оценка влияния средств с антиоксидантным действием на терапевтическую эффективность химиолучевой терапии и оксидантный статус у мышей / А.В. Сипров, И.М. Вашуркина, В.А. Масыгин // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – Т. 8, № 4. – С. 906-910.
5. Скопин П.И. Фармакологическая коррекция эндотоксикоза при злокачественных новообразованиях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саранск, 2013. – 35 с.
6. Кашуро В.А. Патогенетическое и диагностическое значение системы глутатиона в оценке цитотоксического действия противоопухолевых препаратов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Санкт-Петербург, 2009. – 45 с.
7. Кадыров Р.К. Влияние ксимедона на деструктивные изменения в поджелудочной железе, вызванные ишемией // Вестник современной клинической медицины. – 2012. – Т. 5. – № 3. – С. 15-18.
8. Масыгин В.А. Сравнительная оценка влияния ксимедона и мексидола на терапевтический эффект противоопухолевой химиотерапии в эксперименте // Современные тенденции развития науки и технологий: сб. науч. трудов VIII Междунар. науч.-практ. конф. – Белгород, 2015. – № 8. – Ч. III. – С. 110-112.

9. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. – Washington: The National Academies Press, 2011. – 246 p.
10. Лутфуллин М.Х. Оценка острой токсичности и кумулятивных свойств ксимедон гидрохлорида / М.Х. Лутфуллин, Т.В. Гарипов, Е.В. Шабалина // Российский паразитологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 1-4.
11. Воронина Т.А. Ноотропные и нейропротекторные средства / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70. – № 4. – С. 44-58.
12. Хышиктуев Б.С. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение / Б.С. Хышиктуев, Н.А. Хышиктуева, В.Н. Иванов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – № 3. – С. 13-15.
13. Мальцев Г.Ю. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / Г.Ю. Мальцев, Н.В. Тышко // Гигиена и санитария. – 2002. – № 2. – С. 69-72.
14. Верлан Н.В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2008. – 37 с.