

© В.А.Кашуро, С.И.Глушков, А.И.Карпищенко, Т.М.Новикова, Т.И.Глушкова, Л.В.Минаева, С.А.Сибирев, 2006
УДК 616-002.16-08:577.152.1]-092.4

*В.А. Кашуро, С.И. Глушков, А.И. Карпищенко, Т.М. Новикова,
Т.И. Глушкова, Л.В. Минаева, С.А. Сибирев*

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПОВТОРНОМ ВВЕДЕНИИ ЦИКЛОФОСФАНА

*V.A. Kashuro, S.I. Glushkov, A.I. Karpishchenko, T.M. Novikova,
T.I. Glushkova, L.V. Minaeva, S.A. Sibirev*

THE STATE OF THE GLUTATHIONE SYSTEM IN PARENCHYMAL ORGAN TISSUES OF LABORATORY ANIMALS AFTER REPEATED ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Комплексное изучение состояния системы глутатиона и интенсивности процессов перекисного окисления липидов в тканях печени и почек белых беспородных крыс при повторных введениях циклофосфана (ежедневно в течение 3-10 дней в дозах 20 и 40 мг/кг массы на каждое введение). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Спектрофотометрическое определение концентрации восстановленного глутатиона, сульфгидрильных групп белков, малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, каталазы в тканях 50 животных. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано, что данная форма интоксикации сопровождается выраженными изменениями состояния системы глутатиона в тканях печени и почек отравленных животных (снижение содержания сульфгидрильных групп белков, нарушения активности глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы), активацией процессов перекисного окисления липидов. Обсуждены причины возникновения данных биохимических сдвигов, их межтканевые отличия и их роль в реализации цитотоксического действия циклофосфана. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Установлена патогенетическая роль истощения функциональных возможностей системы глутатиона и активации свободнорадикальных процессов в реализации цитотоксического действия алкилирующих препаратов.

Ключевые слова: циклофосфан, глутатион, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза, малоновый диальдегид.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to carry on a complex study of the state of the glutathione system and intensity of lipid peroxidation processes in the liver and kidney tissues in white rats after repeated administration of cyclophosphamide (daily during 3-10 days, in doses 20 and 40 mg/kg in each injection). **MATERIAL AND METHODS.** The concentration of reduced glutathione, sulfhydryl groups of proteins, malondealdehyde, diene conjugates and activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathionereductase, glutathioneperoxidase, glutathione-S-transferase, catalase was determined spectrophotometrically in tissues of 50 animals. **RESULTS.** It was shown that this form of intoxication was accompanied by pronounced changes in the state of the glutathione system in the liver and kidney tissue of the poisoned animals (lower content of sulfhydryl groups of proteins, impaired activity of glutathionereductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione-S-transferase, glutathioneperoxidase), activation of lipid peroxidation processes. The causes of the appearance of these biochemical shifts, their tissue distinctions were discussed as well as their role in realization of the cytotoxic effect of cyclophosphamide. **CONCLUSION.** The pathogenetic role of a depletion of functional possibilities of the glutathione system was established as well as activation of free radical processes in realization of the cytotoxic effect of alkylating drugs.

Key words: cyclophosphamide, glutathione, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malondealdehyde, glutathionereductase, glutathionetransferase.

ВВЕДЕНИЕ

Циклофосфан (ЦФ) является широко используемым противоопухолевым препаратом, который, обладая супрессивной активностью (в отношении как пролиферирующих, так и «покоящихся» иммунокомпетентных клеток – В-лимфоцитов, Т-хелпер-

ных лимфоцитов, предшественников Т-супрессорных лимфоцитов, зрелых Т-супрессорных лимфоцитов, предшественников эффекторных клеток), активно применяется в нефрологии при лечении гломерулонефрита и других заболеваний почек [1]. В то же время препарат не лишен ряда побочных

эффектов, связанных с токсическим поражением тканей паренхиматозных органов [2].

В организме человека и животных, преимущественно в гепатоцитах, под действием микросомальных монооксигеназ происходит метаболическая активация ЦФ, сопровождающаяся повышенной наработкой активных форм кислорода, что и приводит к повреждениям различных макромолекулярных структур клетки (нуклеиновых кислот, ферментов, липидов биомембран) за счет алкилирования реакционно-способными метаболитами и запуска процессов свободнорадикального окисления [3]. Роль системы глутатиона в детоксикации ЦФ заключается в конъюгации некоторых его метаболитов [4, 5], в защите клетки от повреждающего действия свободных радикалов [6], а также в виде участия в процессах репарации поврежденных макромолекул.

Учитывая, что в клинической практике применяется курсовая терапия ЦФ, изучение закономерностей ответа системы глутатиона на токсическое воздействие ЦФ при повторных введениях экспериментальным животным представляет несомненный интерес.

Целью работы явилось изучение показателей системы глутатиона и интенсивности перекисного окисления липидов в тканях печени и почек белых беспородных крыс (самцов) при повторном введении циклофосфана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 190–210 г, приобретенных в питомнике Рапполово РАМН. Цитотоксическое действие циклофосфана моделировали введением препарата в дозе 20 мг/кг и 40 мг/кг массы животного (при внутрибрюшинном введении в виде 2% водного раствора). Длительность введения составила до 10 дней.

Животным контрольной группы по такой же методике внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (0,5 мл/100 г массы). Количество животных в каждой группе составляло 5 особей.

После введения токсиканта через 1, 3, 5, 7, 10 суток животные были декапитированы. Извлеченные печень и почки отмывали холодным физиологическим раствором от крови в течение 35–50 сек. после декапитации и замораживали в жидком азоте, в котором они хранились до момента исследования.

В гомогенатах тканей печени и почек, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере с pH 7,4, проводили определение концентрации восстановленного глутатиона (ВГ), сульфгидрильных

групп белков (СГ), малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгат (ДК). Общую активность глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли в цитозольной фракции, полученной методом дифференциального центрифугирования.

Концентрацию ВГ определяли методом G.L.Ellman [7] в модификации, заключающейся в осаждении белка 20% раствором сульфосалициловой кислоты; содержание СГ – по методике G.Bellomo [8]; концентрацию МДА – по методу M.Uchiyama [9], определение концентрации ДК осуществляли по методике И.Д.Стальной (1977) в нашей модификации. Активность ГР определяли по методу I.Carlborg, B.Mannervik [10], Г-6-Ф-ДГ – по A.Kornberg [11], ГП – по методу А.Н.Гавриловой, Н.Ф.Хмары [12] с использованием в качестве субстрата гидроперекиси трет-бутила, ГТ – по W.H.Nabig, W.B.Jakoby [13]. Расчет активности ферментов производили на грамм белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури в модификации G.L.Peterson [14]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Microsoft Excel» с использованием t критерия Стьюдента для двух несвязанных величин.

Одномоментно с биохимическими исследованиями проводилось морфологическое исследование образцов тканей печени и почек, для чего образцы этих органов помещались в нейтральный 10% раствор формалина. Гистологические препараты окрашивались гематоксилином-эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное исследование позволило установить, что повторное введение циклофосфана длительностью от 1 до 10 дней в дозах 20 мг/кг, 40 мг/кг сопровождаются существенными изменениями состояния показателей системы глутатиона в тканях печени и почек отравленных животных.

При определении концентрации сульфгидрильных групп тканевых белков наиболее значимые изменения отмечались в тканях печени (табл. 1). Так, при введении дозы 20 мг/кг начало существенного снижения концентрации СГ приходилось на 3-й день эксперимента и по сравнению с интактной группой составило 8,5%, на 10-й день – 14,5%. При дозе 40 мг/кг концентрация СГ снизилась на 16,3% на 7-й день введения. В тканях почек изменение концентрации СГ было несколько иным: на 5-е сутки после введения циклофосфана в дозе 20 мг/кг концентрация СГ увеличилась в 1,3 раза, с последующим снижением при дальнейших введениях препарата.

Динамика изменений концентрации сульфгидрильных групп тканевых белков в тканях различных органов белых беспородных крыс при повторных введениях циклофосфана в дозах 20 мг/кг и 40 мг/кг (мкмоль/г ткани)

Таблица 1

Группа исследования	Сроки исследования	Исследуемый орган	
		печень	почки
Контроль		18,61±0,43	11,40±0,94
Циклофосфан, 20 мг/кг	1 сут	18,85±0,74	12,50±0,69
	3 сут	17,03±0,45*	12,95±0,75
	5 сут	17,03±0,63*	14,85±0,81*
	7 сут	16,63±0,35*	14,35±2,18
	10 сут	15,91±0,69*	13,84±1,93
Циклофосфан, 40 мг/кг	1 сут	17,30±0,50*	12,80±0,67
	3 сут	17,15±0,34*	10,94±1,53
	5 сут	15,84±0,49*	10,31±0,67
	7 сут	15,57±0,31*	9,81±1,12

* – достоверность отличия $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

Сравнительная оценка влияния двух исследуемых доз при различной длительности введения ЦФ на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях отравленных животных позволила выявить дозозависимый характер угнетения активности фермента (табл. 2). Во всех исследуемых тканях использование ЦФ в дозе 40 мг/кг вызывало наиболее длительное и глубокое снижение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности. Наиболее раннее и значительное снижение активности исследуемого фермента происходило в тканях печени, тогда как в тканях почек падение активности Г-6-Ф-ДГ отмечалось лишь на 7-е сутки эксперимента.

Проведенное исследование показало, что при повторном введении ЦФ отмечаются выраженные сдвиги со стороны активности ферментов антиоксидантной защиты – глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы.

Длительное введение ЦФ в невысоких дозах

Динамика изменений активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях различных органов белых беспородных крыс при повторных введениях циклофосфана в дозах 20 мг/кг и 40 мг/кг (мкмоль/(мин • г белка))

Таблица 2

Группа исследования	Сроки исследования	Исследуемый орган	
		печень	почки
Контроль		56,71±5,40	12,56±1,03
Циклофосфан, 20 мг/кг	1 сут	37,36±8,73*	10,44±0,83
	3 сут	31,98±6,12*	14,09±2,22
	5 сут	38,38±3,67*	13,86±1,84
	7 сут	31,03±2,23*	13,98±0,76
	10 сут	21,92±2,77*	10,19±0,67*
Циклофосфан, 40 мг/кг	1 сут	34,34±5,80*	11,48±0,99
	3 сут	34,23±7,91*	15,01±1,74
	5 сут	32,90±3,75*	10,61±0,82
	7 сут	23,55±2,48*	9,59±1,04*

* – достоверность отличия $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

сопровождается усилением ферментативной активности ГП в паренхиматозных тканях лабораторных животных, выраженность которого нивелируется по мере увеличения используемой дозы токсиканта. Наибольшее усиление активности ГП наблюдалось в тканях почек. Так, при отравлении ЦФ в дозе 20 мг/кг через 1 сутки отмечалось выраженное усиление активности фермента, которое достигало максимума через 3 дня введения препарата и увеличение по сравнению с контрольной группой составило в 1,42 раза ($p < 0,05$). В тканях печени наблюдалось достоверное, но более умеренное по сравнению с почками усиление активности ГП с максимумом через 5 суток после введения токсиканта в дозе 20 мг/кг – на 36,6% ($p < 0,05$), а затем появление тенденции к ее частичному снижению до значений ниже контрольных.

На направленность изменений активности ГТ в тканях отравленных животных существенно влияла величина вводимой дозы токсиканта: в тканях печени после введения токсиканта в дозе 20 мг/кг активность ГТ прогрессивно нарастала и через 7 суток в 2 раза ($p < 0,05$) превышала значения интактного контроля. При введении дозы ЦФ 40 мг/кг первоначальное повышение активности ГТ через 1 сутки на 44,8% ($p < 0,05$) сменялось ее угнетением на 28,2% ($p < 0,05$) ниже значений контроля через 7 суток. Такая же зависимость направленности изменений активности ГТ от величины вводимой дозы ЦФ отмечалась в тканях почек, хотя в этом органе сдвиги были менее выраженными.

Повторное введение ЦФ в дозах 20 мг/кг и 40 мг/кг сопровождаются активацией процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует накопление как начальных продуктов ПОЛ – ДК, так и конечных – МДА (табл. 3). При этом отчетливый дозозависимый характер накопления продуктов ПОЛ отчетливо проявлялся во всех тканях отравленных животных.

Так, введение ЦФ в дозе 40 мг/кг вызывало достоверное ($p < 0,05$) повышение содержания как МДА, так и ДК в тканях печени в течение всего периода исследования с максимальным накоплением через 10 суток – в 1,61 и 1,99 раза, соответственно выше значений контроля. Накопление продуктов ПОЛ в тканях почек происходило менее выражено. Через 10 суток после введения ЦФ в дозе 20 мг/кг в тканях почек максимально возрастало ($p < 0,05$) со-

Динамика изменений концентрации малонового диальдегида в тканях различных органов белых беспородных крыс при повторных введениях циклофосфана в дозах 20 мг/кг и 40 мг/кг (нмоль/г ткани или нмоль/г гемоглобина)

Таблица 3

Группа исследования	Сроки исследования	Исследуемый орган	
		печень	почки
Контроль		166,31±8,68	377,69±10,10
Циклофосфан, 20 мг/кг	1 сут	188,88±8,39*	459,34±5,31*
	3 сут	242,94±18,50*	485,90±20,75*
	5 сут	248,03±5,68*	496,66±12,86*
	7 сут	254,28±16,45*	517,04±17,90*
	10 сут	267,93±14,14*	614,37±55,61*
Циклофосфан, 40 мг/кг	1 сут	199,93±10,71*	432,22±13,87*
	3 сут	218,88±17,64*	455,27±34,78*
	5 сут	339,14±7,11*	477,77±13,55*
	7 сут	353,42±8,49*	495,93±15,25*

* – достоверность отличия $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

держания продуктов липопероксидации: ДК – на 30,5 % выше нормы, а МДА – на 62,7%.

При морфологическом исследовании в гепатоцитах в ранние сроки исследования отмечались признаки гипоксического воздействия на клетку, что проявлялось зернистой дистрофией гепатоцитов. В более поздние сроки в гепатоцитах определялась мелкокапельная и среднекапельная жировая дистрофия, гиперхромия ядер, расширение синусоид и увеличение в размерах эндотелиоцитов (набухание). Данные изменения соответствовали проявлениям выраженного острого (мелкокапельная жировая дистрофия) и несколько протянутого во времени (наличие среднекапельной жировой дистрофии) токсического воздействия на гепатоциты. В тканях почек на протяжении всего срока исследования определялась зернистая дистрофия эпителия проксимальных канальцев нефрона, в части эпителиоцитов на фоне зернистой дистрофии в части клеток наблюдались явления вакуольной дистрофии. Данные изменения соответствовали проявлениям гипоксического воздействия на клетку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксические эффекты при повторном введении ЦФ отчетливо проявлялись в виде существенных нарушений состояния системы глутатиона и активации ПОЛ в тканях печени и почек отравленных животных: падения концентрации сульфгидрильных групп тканевых белков; угнетения активности ферментов, принимающих участие в восстановлении глутатиона из окисленной формы (глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы); падения активности антиоксидантных энзимов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-

трансферазы); нарушение конъюгирующей функции системы глутатиона в результате падения активности глутатион-S-трансферазы; увеличения концентрации МДА.

В ходе эксперимента было установлено нарушение одной из функций изучаемой биохимической системы, связанной с поддержанием тиол-дисульфидного равновесия – ведущего регулирующего фактора активности ряда ферментативных систем. Нарушение функции системы глутатиона по поддержанию тиол-дисульфидного равновесия может лежать в основе реализации ряда цитотоксических эффектов действия ЦФ, так как сохранение в клетке динамического равновесия между белковыми тиолами и дисульфидами необходимо для осуществления практически всех процессов жизнедеятельности клеток, таких как работа мембранных структур, деятельность цитоскелета, клеточное деление и т.д.

Угнетение активности Г-6Ф-ДГ и ГР, особенно определяемое в тканях печени после использования ксенобиотика в дозе 40 мг/кг, говорит об истощении резервов исследуемой биохимической системы в условиях интоксикации ЦФ, что может свидетельствовать о глубоких нарушениях функции ее саморегуляции. Снижение глутатионредуктазной активности может стать в дальнейшем причиной падения уровня ВГ и угнетения активности ферментов, использующих его для утилизации продуктов пероксидации, – глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы.

Применение ЦФ в нашем эксперименте вызвало выраженную интенсификацию свободнорадикальных процессов, при этом активность системы антирадикальной защиты оказывается недостаточной для прерывания этих процессов, что подтверждается накоплением продуктов ПОЛ в тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных сведений о динамике изменений показателей системы глутатиона и ПОЛ показывает, что повторное введение ЦФ в дозе 20 мг/кг, в основном, сопровождается адаптивными сдвигами со стороны ферментативного звена антиперекисной защиты в тканях (сохранение или даже рост активности энзимов). Введение препарата в дозе 40 мг/кг сопровождается предельным напряжением, а затем и срывом приспособительных возможностей системы антирадикальной защиты в виде снижения концентрации сульфгидрильных групп белков и падения активности ее ферментативного звена. Наиболее выраженное снижение

показателей системы глутатиона и интенсификация процессов перекисного окисления липидов происходили на 7–10-е сутки исследования, что может свидетельствовать о кумулятивном эффекте повторного введения ЦФ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Винькова ЕМ, Баталин ВА. Пульстерапия цитостатиками больных гломерулонефритом. *Сборн трудов III нефрол семинара*. СПб, 1995: 225–226
2. Машковский МД. *Лекарственные средства*. Вильнюс, 1993; 2: 528
3. Проценко ЛД, Булкина ЗП. *Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов*. Наук думка, Киев, 1985; 286
4. Тиунов ЛА. Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты. *Вестник РАМН* 1995; (3):9–13
5. Gurtoo HL, Hipkens JH, Sharma SD. Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Res* 1981; 41 (9): 3584-3591
6. Yuan ZM, Smith PB, Brundrett RB et al. Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide.

A mechanistic study using tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 1991; 19 (3): 625-629

7. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1): 70-77

8. Bellomo G, Thor H, Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. *Meth Enzymol* 1990; 186: 627-635

9. Uchiyama M, Michara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86 (1): 271-278

10. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol* 1985; 113:484-490

11. Kornberg A, Horecker BL, Smyrniot PZ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase – 6-phosphogluconic dehydrogenase. *Meth Enzymol* 1955; 1.1:323-327

12. Гаврилова АН, Хмара НФ. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстратов. *Лаб дело* 1986; (12): 21- 24

13. Habig WH, Jakoby WB. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth Enzymol* 1981; 77: 398-405

14. Peterson GL. Simplification of protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83 (2): 346-356

Поступила в редакцию 19.05.2006 г.