

© Ю.В.Саенко, А.М.Шутов, С.М.Напалкова, О.С.Селиванова, 2005
УДК 616-092.19:611.61]615.779.9.001.5

Ю.В. Саенко, А.М. Шутов, С.М. Напалкова, О.С. Селиванова

ЭРИТРОПОЭТИН СНИЖАЕТ ПРОЯВЛЕНИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО ДОКСОРУБИЦИНОМ, В ПОЧКАХ КРЫС

Yu. V. Saenko, A. M. Shutov, S. M. Napalkova, O. S. Selivanova

ERYTHROPOIETIN ATTENUATES MANIFESTATIONS OF OXIDATIVE DOXORUBICIN-INDUCED STRESS IN RAT KIDNEYS

Кафедра фармакологии, Кафедра терапии и профессиональных болезней медицинского факультета Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью исследования явилось определение возможности коррекции эритропоэтином оксидативного стресса, индуцированного доксорубицином, в почках крыс. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование выполнено на беспородных белых крысах. Одной группе животных (группа ДОК, n=7) внутрибрюшинно вводили доксорубицин, другой внутрибрюшинно доксорубицин с одновременным внутривенным введением эритропоэтина (группа ЭПО, n=7). Забой животных, включая контрольную группу (группа Контроль, n=7), проводили через 24 часа. В гомогенате тканей почек исследовали содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатион-S-трансферазы (G-S-T), активность цитоплазматической НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы 1 (НХО 1), активность глутатион редуктазы (ГР), содержание белковых карбонильных групп. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Введение доксорубицина привело к снижению уровня GSH ($0,061 \pm 0,017$ против $0,089 \pm 0,011$ мкмоль/мг ткани в контрольной группе, $p < 0,05$) и активности ГР ($62,10 \pm 8,04$ против $85,80 \pm 7,18$ нмоль/мин/мг белка в контрольной группе, $p < 0,05$) в гомогенате почек. Введение эритропоэтина предотвращало снижение GSH и активности ГР и приводило к увеличению активности НХО 1 в гомогенате почек. Разницы в содержании белковых карбонильных групп в гомогенате почек в исследуемых группах животных не отмечено. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Эритропоэтин ослабляет проявления оксидативного стресса, вызванного доксорубицином, в почках крыс.

Ключевые слова: глутатион, доксорубицин, оксидативный стресс, эритропоэтин.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to determine possibilities of erythropoietin correction of oxidative doxorubicin -induced stress in rat kidneys. **MATREIAL AND METHODS.** The investigation was fulfilled in white rats. One group of animals (n=7) was given intraperitoneal injections of doxorubicin, in the other group doxorubicin was injected intraperitoneally simultaneously with intravenous injection of erythropoietin (n=7). The animals including a control group (n=7) were killed in 24 hours. The content of the reduced glutathione (GSH), activity of glutathione-S-transferase (G-S-T), activity of cytoplasm NADPH:quinone oxidoreductase 1 (HXO 1), activity of glutathione reductase (GR), the content of protein carbonyl groups were investigated in homogenate of the kidney tissue. **RESULTS.** The introduction of doxorubicin resulted in lower level of GSH ($0,061 \pm 0,017$ versus $0,089 \pm 0,011$ mkmol/mg of tissue in the control group, $p < 0,05$) and activity of GR ($62,10 \pm 8,04$ versus $85,80 \pm 7,18$ nmol/min/mg of protein in the control group, $p < 0,05$) in the kidney homogenate. The introduction of erythropoietin prevented attenuation of GSH and activity of GR and led to increased activity of HXO 1 in the kidney homogenate. **CONCLUSION.** No difference was noted between the content of protein carbonyl groups in the kidney homogenate in the investigated groups of animals.

Key words: erythropoietin, glutathione, doxorubicin, oxidative stress, kidney.

ВВЕДЕНИЕ

Доксорубицин (ДОК) – эффективный противоопухолевый антрациклиновый антибиотик. Клиническое использование ДОК сопряжено с определенными трудностями, связанными с высокой кардио- [1] и, в меньшей степени, нефротоксичностью препарата [2]. В клетках опухоли токсичность доксорубицина реализуется преимущественно через ингибирование ферментов репликации ДНК. В результате интеркаляции доксорубицина в спираль ДНК блокируется активность ДНК-топоизомеразы, в результате

чего нарушается клеточный цикл и запускается механизм программируемой клеточной смерти [1].

В нормальных тканях токсичность препарата обусловлена активными формами кислорода, которые образуются в результате редокс-циклических реакций, а также влияния доксорубицина на обмен железа. Вызванное доксорубицином увеличение продукции активных форм кислорода приводит к снижению содержания в клетках восстановленного глутатиона (GSH), уменьшению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала и

через ряд внутриклеточных сигнальных механизмов запускает программу апоптоза [3,4].

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что снизить токсичность ДОК можно путем введения веществ, способных поддержать внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал и (или) активировать ферменты, участвующие в детоксикации препарата.

В последние годы установлена способность эритропоэтина препятствовать развитию оксидативного стресса при инфаркте миокарда [5], геморрагическом шоке [6], повреждении спинного мозга [7].

Целью работы явилось исследование влияния эритропоэтина на индуцированный доксорубицином оксидативный стресс в почках крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 21 самце беспородных белых крыс весом 300 – 340 г в возрасте 21-23 недели. Животные были разделены на 3 группы: контрольная группа (Контроль, n=7); группа, в которой животным для индукции оксидативного стресса внутрибрюшино вводился доксорубицин («Фармсинтез», Москва) из расчета 7,5 мг/кг массы животного (ДОК, n=7); группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили эритропоэтин (Эпокрин, Санкт-Петербург) в дозе 1200 МЕ/кг (ЭПО, n = 7).

Забой животных проводили через 24 часа путем декапитации. Перед декапитацией животным вводился тиопентал натрия.

Для приготовления общей цитоплазматической фракции, левую почку растирали при 4° С в гомогенизаторе Поттера с буфером, содержащим 0,1 моль KCl, 0,25 моль сахарозы, 1 ммоль ЭДТА, 20 ммоль Трис-HCl (pH=7,0), 1 ммоль фенолметилсульфонил фторида, далее экстракт центрифугировали при 10000 g, супернатант отбирали и хранили до использования при -20° С.

Активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) определяли спектрофотометрически при 25° С, с 1-хлоро-2,4-динитробензолом в качестве субстрата [8]. Реакционная смесь содержала в конечном объеме 3,0 мл – 0,1 М фосфатного буфера (pH = 6,5), 1 ммоль глутатиона восстановленного, 1 ммоль субстрата. Определялось возрастание оптической плотности при 340 нм в течение 3 минут. Определялась скорость неферментативной реакции и вычиталась из полученного результата для каждого определения. Активность фермента выражалась в мкмоль субстрата/минута/мг белка, для пересчета был использован коэффициент экстинции 9,6 ммоль⁻¹см⁻¹.

Активность цитоплазматической НАД(Ф)Н:хи-

нон оксидоредуктазы 1 (НХО 1) определялась методом Фишера [9], с 2,6-дихлорофенолиндофенолом в качестве субстрата. Реакционная смесь содержала, в конечном объеме 1,0 мл – 50 ммоль Трис буфера pH 7,5; 0,23 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 0,08% Тритон X-100, 100 мкмоль субстрата, 300 мкмоль НАДН. Определялось уменьшение оптической плотности при 600 нм. Определялась скорость неферментативной реакции и вычиталась из полученного результата для каждого определения. Активность НХО 1 выражали в нмоль/мин на 1 мг белка, для пересчета был использован коэффициент экстинции 21 ммоль⁻¹см⁻¹.

Активность глутатион редуктазы (ГР) определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм и выражали через количество окисленного НАДФН в мкмоль/мин на 1 мг белка [10]. Реакционная смесь содержала: 1,0 ммоль глутатиона окисленного, 0,1 ммоль НАДФН, 0,5 ммоль ЭДТА, 0,1 М фосфатного буфера (pH=7,6). Для пересчета был использован коэффициент экстинции 6,22 ммоль⁻¹см⁻¹.

Содержание белковых карбонильных групп определяли 2,4-динитрофенилгидразиновым методом по методике Левина с соавт. [11]. Предварительно из образца удалялась ДНК в реакции преципитации с 1% сульфатом стрептомицина. Далее образец, содержащий 50-100 мкг белка, осаждали 10% трихлоруксусной кислотой, осадок дважды промывали ТХУ и растворяли в 0,5 мл 2М HCl, содержащей 10 ммоль 2,4-динитрофенилгидразина, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем добавляли 0,5 мл 20% ТХУ, центрифугировали при 5000 g, осадок трижды промывали смесью этанол-этилацетат и растворяли в 3 мл 8М мочевины. Оптическую плотность измеряли при 370 нм. Количество карбонильных групп выражали в нмоль на 1 мг белка, для пересчета использовали коэффициент экстинции 21 ммоль⁻¹см⁻¹.

Концентрацию глутатиона восстановленного (GSH) определяли в реакции с 5,5'-дителио-бис-нитробензойной кислотой (ДНТБ) [12]. Навеску ткани растирали при 4° С в ступке с 2 объемами 1,15% KCl, экстракт центрифугировали при 3000 g, супернатант депротеинизировали добавлением равного объема 4% сульфосалициловой кислоты и использовали для определения GSH. Реакционная смесь содержала 0,25 мл депротеинизированного супернатанта, 2,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH = 8,0). Реакцию запускали добавлением 0,25 мл 1 ммоль ДНТБ. Оптическую плотность измеряли через 15 минут при длине волны 412 нм, для пересчета использовали коэффициент экстинции 14,15 ммоль⁻¹см⁻¹. Количество GSH выражали в мкмоль на 1 мг ткани.

Концентрацию белка в пробах оценивали при помощи метода Бредфорда [13].

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Манна-Уитни. Показатели представлены как $\bar{X} \pm SD$. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования активности ферментов и концентрации ГSH в гомогенате ткани почек представлены на рисунках 1- 3. Как видно из рис. 1 доксорубин вызывал снижение концентрации глутатиона восстановленного в паренхиме почек (ГSH) по сравнению с контролем почти на 30%. В группе животных, которым перед введением доксорубина вводили эритропоэтин, концентрация глутатиона, восстановленного в тканях почек, статистически не отличалась от контрольной группы.

В группе ДОК активность глутатион-редуктазы была достоверно ниже, чем в контрольной группе. Введение эритропоэтина перед инъекцией доксорубина предотвращало индуцированное доксорубином снижение активности ГР в гомогенате почек (рис. 2).

Введение доксорубина не вызывало достоверных изменений активности НХО 1. При совместном введении доксорубина с эритропоэтином активность НХО 1 в гомогенате почечной ткани была достоверно выше по сравнению с группой ДОК (рис. 3).

Введение доксорубина не приводило к изменению активности глутатион-S-трансферазы в сравнении с контрольной группой ($0,105 \pm 0,025$ против $0,118 \pm 0,015$ мкмоль/мин/мг белка соответственно, $p > 0,05$). В гомогенате почек животных, которым перед инъекцией доксорубина внутривенно вводили эритропоэтин, активность GST ($0,122 \pm 0,0200$ мкмоль/мин/мг белка) не отличалась от аналогичного показателя в группах Контроль ($p > 0,05$) и ДОК ($p > 0,05$).

Не выявлено достоверных различий в содержании карбонильных групп белковых молекул у крыс, получавших препараты, и животных контрольной группы. В контрольной группе их содержание составило $2,13 \pm 1,01$ мкмоль/мг белка, в группе ДОК – $4,21 \pm 2,36$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$), в группе ЭПО – $2,961,98$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет выявили два основных механизма токсичности доксорубина в отношении нормальных тканей. Первый механизм заключается в формировании комплекса доксорубина и Fe^{2+} , что может приводить к образова-

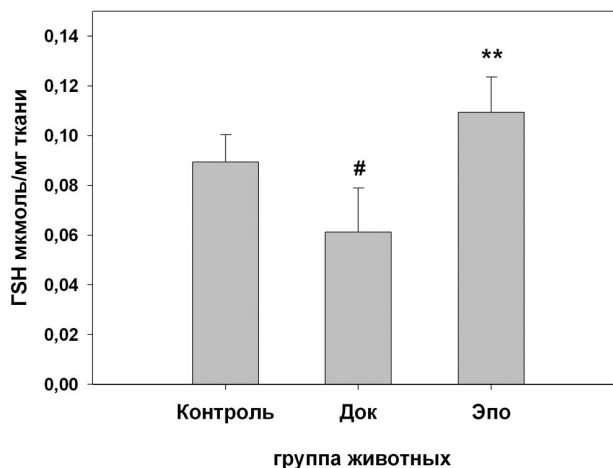


Рис. 1. Влияние доксорубина (Док) и совместного введения доксорубина с эритропоэтином (Эпо) на концентрацию восстановленного глутатиона (ГSH) в гомогенате почечной ткани. ** – $p < 0,01$ (различие с группой ДОК); # – $p < 0,05$ (различие с группой Контроль).

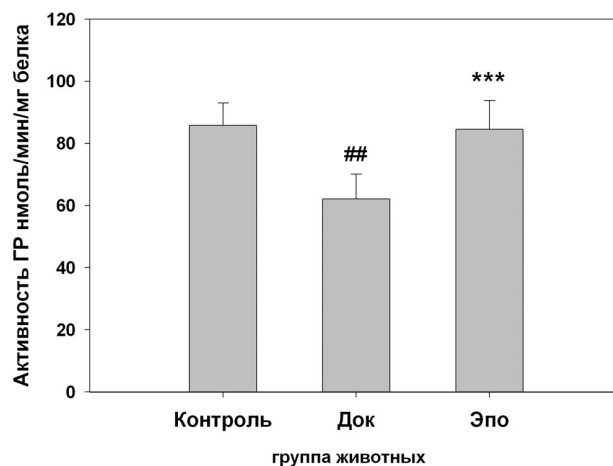


Рис. 2. Влияние доксорубина (Док) и совместного введения доксорубина с эритропоэтином (Эпо) на активность глутатион редуктазы (ГР) в гомогенате почечной ткани. *** – $p < 0,001$ (различие с группой ДОК); ## – $p < 0,01$ (различие с группой Контроль).

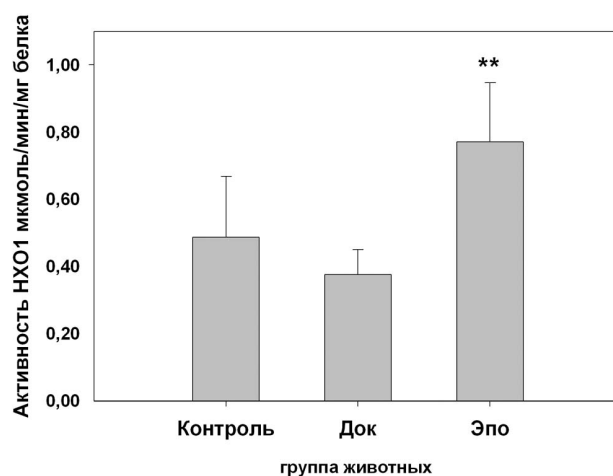


Рис. 3. Влияние доксорубина (Док) и совместного введения доксорубина с эритропоэтином (Эпо) на активность НАД(Ф)Н:хинон оксидиредуктазы 1 (НХО1) в гомогенате почечной ткани. ** – $p < 0,01$ (различие с группой ДОК).

нию гидроксильного радикала и инициации цепных реакций с вырожденным разветвлением. Антрациклиновые антибиотики могут способствовать высвобождению ионов Fe^{2+} из ферритина в результате взаимодействия с этим белком, либо опосредованно, через генерацию супероксид анион-радикала, тем самым усугубляя оксидативный стресс [14].

Второй механизм цитотоксичности доxorубина связан с его редокс-циклической активностью внутри клетки [15]. В основе этого механизма лежит способность флавиновых редуктаз (цитохром-Р-450 редуктаза, цитохром b_5 -редуктаза, НАДН-дегидрогеназа, ксантин-оксидаза) восстанавливать доxorубин из формы хинона до семихинона, т.е. осуществлять одноэлектронное восстановление. Доxorубин, в форме семихинона, является свободным радикалом и способен восстанавливать кислород до супероксид анион-радикала. В ходе реакции с кислородом, кроме супероксид анион-радикала, генерируется исходная форма доxorубина (т.е. хинон) [14,15]. Цикл одноэлектронного восстановления/окисления доxorубина может функционировать достаточно продолжительное время и вызывать внутриклеточный оксидативный стресс, который приводит к снижению внутриклеточной концентрации GSH, и как следствие, к снижению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала [16]. Установлено, что снижение внутриклеточной концентрации GSH может запускать митохондриальный путь реализации апоптоза [4]. В работах последних лет отмечается, что токсический эффект антрациклиновых антибиотиков в отношении нормальных тканей реализуется, в основном, через индукцию апоптоза [1,17].

Полученные нами данные свидетельствуют, что введение крысам доxorубина приводит к снижению концентрации GSH в паренхиме почки, это согласуется с литературными данными [2]. Эритропоэтин предотвращал индуцированное доxorубином снижение GSH в почечной ткани, что является благоприятным эффектом. Механизмы, с помощью которых эритропоэтин препятствовал снижению содержания восстановленного глутатиона, требуют дополнительных исследований. Возможно, такой эффект связан с активацией эритропоэтином JAK/STAT сигнальных путей, которые принимают участие в поддержании внутриклеточного редокс-потенциала [7]

Положительным эффектом эритропоэтина является обнаруженная нами активация препаратом НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы I. Этот фермент защищает клетки от токсического воздействия веществ хиноидной природы путем осуществления

двухэлектронного восстановления хинонов до стабильных гидрохинонов. Такая реакция снижает возможность одноэлектронного восстановления доxorубина до семихинона [18]. Кроме того, НХО1 обладает рядом других защитных функций, например, поддерживает в восстановленном состоянии коэнзим Q_{10} – один из основных антиоксидантов мембран клеток, восстанавливает α -токоферол гидрохинон в α -токоферол и участвует в детоксикации супероксид-анион радикала [19]. Увеличение активности НХО1 положительно отражается на способности клеток противостоять доxorубин-индуцированному оксидативному стрессу, тогда как снижение активности НХО1 вызывает повышенную чувствительность к веществам хиноидной природы, к которым относятся все антрациклиновые антибиотики [18,19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эритропоэтин снижает доxorубин-индуцированный оксидативный стресс в тканях почек. Основными механизмами, обеспечивающими защиту почки от доxorубин-индуцированного оксидативного стресса, являются поддержание уровня восстановленного глутатиона, индукция активности ферментов НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы I и глутатион редуктазы.

Благодарности. Исследование поддержано грантом «Университеты России», Грант УР 11.01.029

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Abdelrahman EJ, Sharples MC, McDonald AF et al. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004; 22: 63-69
2. Anusevicius Z, Sarlauskas J, Cenas N. Two-electron reduction of quinones by rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase: quantitative structure-activity relationships. *Arch Biochem Biophys* 2002; 404: 254-256
3. Arola O, Saraste A, Pulkki K. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 1789-1792
4. Basser RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1993; 19: 57-77
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
6. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975; 250: 5475-5480
7. Celik A, Gokmen N, Erbayraktar S et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2258-2263
8. Dziegiel P, Suder E, Surowiak P et al. Role of exogenous melatonin in reducing the nephrotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *J Pineal Res* 2002; 33: 95-100
9. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem*

Biophys 1972; 82: 70-77

10. Fisher GR, Gutierrez PL. Free radical formation and DNA strand breakage during metabolism of diaziquone by NAD(P)H quinone-acceptor oxidoreductase (DT-diaphorase) and NADPH-cytochrome c reductase. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 359-370

11. Habig WG, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139

12. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4928-4944

13. Levin RL, Garland D, Oliver CN et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzym* 1990; 186: 464-478

14. Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J* 1999; 13: 199-212

15. Parsa C, Kim J, Riel R et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart. *J Biol Chem* 2004; 279: 20655-20662

16. Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad Biol Med* 1989; 6: 63-101

17. Schafer QF, Buettiner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001; 30: 1191-1212

18. Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL et al. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 1238-1247

19. Sun X, Zhou Z, Kang JY. Attenuation of doxorubicin toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Res* 2001; 61: 3382-3387

20. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933

Поступила в редакцию 26.01.2005 г.