

© Ю.В.Саенко, С.М.Напалкова, А.М.Шутов, Г.Т.Брынских, 2005
УДК [616-092.19-02:615.5-08].001.5

Ю.В. Саенко, С.М. Напалкова, А.М. Шутов, Г.Т. Брынских

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО ДОКСОРУБИЦИНОМ, В ПОЧКАХ КРЫС

Yu.V.Saenko, S.M.Napalkova, A.M.Shutov, G.T.Brynskikh

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN KIDNEYS OF RATS

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

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Доксорубин (ДОК) – антрациклиновый антибиотик с широким спектром противоопухолевой активности. Использование ДОК сдерживается кардио- и нефротоксичностью препарата, которая реализуется, в том числе, через индукцию оксидативного стресса. Целью исследования явилось определение возможности фармакологической коррекции оксидативного стресса, вызванного доксорубицином, в почках крыс. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование выполнено на 35 самцах беспородных белых крыс. Животные были разделены на 5 групп: контрольная группа (контроль, n=7), группа, в которой животным внутрибрюшинно вводился доксорубин из расчета 7,5 мг/кг массы (ДОК, n=7); группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили гормон эпифиза мелатонин в дозе 1 мг/кг (МЕЛ, n=7), группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили аминокислоту глицин в дозе 50 мг/кг (глицин, n=7), группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили унитиол в дозе 5 мг/кг (унитиол, n=7). Забой животных проводили через 24 часа путем декапитации. В гомогенате ткани почки исследовали содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T), активность цитоплазматической НАД(Ф)Н: хинон оксидоредуктазы 1 (НХО1), активность глутатион редуктазы (ГР), содержание белковых карбонильных групп. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Введение доксорубина приводило к снижению уровня GSH и активности ГР. Разницы в содержании белковых карбонильных групп не отмечено. Предварительное введение мелатонина и глицина приводило к нормализации GSH, активности ГР и увеличению активности НХО 1 в ткани почек. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Гормон эпифиза мелатонин и аминокислота глицин ослабляют проявления оксидативного стресса, индуцированного доксорубицином, в почках крыс.

Ключевые слова: глицин, глутатион, доксорубин, оксидативный стресс, мелатонин, унитиол.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was Doxorubicin (DOX) as a widely used anthracycline antibiotic. Administration of DOX is limited due to cardio- and renal toxicity because of oxidative stress. Our aim was to investigate early nephrotoxic effects of a single dose of DOX and impact of pretreatment with melatonin, glycine and unithiol. **MATERIAL AND METHODS.** The animals (35 rats) were divided into 5 groups. One group (C-group, n=7) was a control, one group (DOX-group, n=7) received DOX (7.5 mg/kg, i.p.), one group (M-group, n=7) was pretreated with melatonin (1 mg/kg, i.v.), one group (G-group, n=7) was pretreated with glycine (50 mg/kg, i.v.), one group (U-group, n=7) was pretreated with unithiol (5 mg/kg, i.v.). The rats were decapitated within 24 hours. The content of glutathione (GSH), glutathione reductase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione-S-transferase and protein carbonyl group in the homogenate of renal mass were detected. **RESULTS.** Less concentration of GSH was detected in the renal tissue in the DOX-group as compared with the C-group of rats. There were lower levels of GSH in DOX-group as compared with M-group. Activity of glutathione reductase was lower in the DOX-group than in the C-group. There was no difference in the content of protein carbonyl groups. Pretreatment with melatonin and glycine resulted in normalization of GSH levels. **CONCLUSION.** It was shown that pretreatment with melatonin and glycine reduced the DOX induced renal damage in rats by means of restoration of GSH in the renal tissue.

Key words: glycine, glutathione, doxorubicin, oxidative stress, melatonin, unithiol.

ВВЕДЕНИЕ

Доксорубин (ДОК) – антрациклиновый антибиотик с широким спектром противоопухолевой активности [1]. В клетках опухоли цитотоксичность доксорубина реализуется преимущественно через ингибирование ферментов репликации ДНК. В результате интеркаляции доксорубина в спираль ДНК блокируется активность ДНК-топоизомеразы и, как следствие, нарушается клеточный цикл и запускается механизм программируемой клеточной смерти [2].

Применение доксорубина ограничивается высокой кардио- [3] и, в меньшей степени, нефротоксичностью препарата [4, 9]. В нормальных тканях доксорубин-индуцированная цитотоксичность связана с активными формами кислорода, образующимися в результате редокс-циклических реакций [5], а также с влиянием доксорубина на обмен железа [6]. Вызванное доксорубином увеличение продукции активных форм кислорода приводит к снижению внутриклеточного содержания восста-

новленного глутатиона (GSH) и, как следствие, к уменьшению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала, что в итоге через ряд внутриклеточных сигнальных механизмов приводит к запуску программы апоптоза [7].

В этой связи можно предположить, что снизить токсичность ДОК можно путем введения веществ, способных поддерживать внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал или активировать ферменты, участвующие в детоксикации препарата. В последние годы в литературе обсуждается антиоксидантная активность мелатонина и его способность снижать проявления доксирубин-индуцированной кардио- и нефротоксичности [8, 9]. Кроме того, представляет интерес исследование антиоксидантных свойств аминокислоты глицин, а также унитиола, который является донором SH-групп. Глицин оказывает защитный эффект при оксидативном стрессе, вызванном интоксикацией этанолом [10] и хлоридом кадмия [11], а унитиол обладает способностью увеличивать активность ряда ферментов антиоксидантной защиты [12].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния веществ, обладающих способностью активировать внутриклеточную антиоксидантную защиту: мелатонина, глицина и унитиола на доксорубин-индуцированный оксидативный стресс в почках крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 35 самцах беспородных белых крыс весом 300 – 340 г, возраста 21–23 недели. Животные были разделены на 5 групп: контрольная группа (контроль, $n=7$); группа, в которой животным внутрибрюшинно вводился доксорубин («Фармсинтез», Москва) из расчета 7,5 мг/кг массы животного (ДОК, $n=7$); группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили гормон эпифиза – мелатонин (ICN, США) в дозе 1 мг/кг (МЕЛ, $n=7$); группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили аминокислоту глицин (ICN, США) в дозе 50 мг/кг (глицин, $n=7$); группа, в которой животным перед инъекцией ДОК внутривенно вводили унитиол (ICN Октябрь г. Санкт-Петербург) в дозе 5 мг/кг (унитиол, $n=7$).

Забой животных проводили через 24 часа путем декапитации. Для приготовления общей цитоплазматической фракции, левую почку растирали при 4° С в гомогенизаторе Поттера с буфером, содержащим 0,1 KCl, 1 ммоль ЭДТА, 20 ммоль Трис-HCl ($pH=7,0$), 1 ммоль фенилметилсульфонил 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 [13]. 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 экстинкции 9,6 ммоль⁻¹см⁻¹.

Активность цитоплазматической НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы 1 (НХО 1) определялась методом Фишера [14], 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 НХО1 выражали в нмоль/мин на мг белка, для пересчета был использован коэффициент экстинкции 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 [15]. 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 экстинкции 6,22 ммоль⁻¹см⁻¹.

Содержание белковых карбонильных групп определяли 2,4-динитрофенилгидразиновым методом по методике Левина с соавт. [16]. 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 8 М мочевины. Оптическую плотность измеряли при 370 нм. Количество карбонильных групп выражали в нмоль на 1 мг белка, для пересчета использовали коэффициент экстинкции 21 ммоль⁻¹см⁻¹.

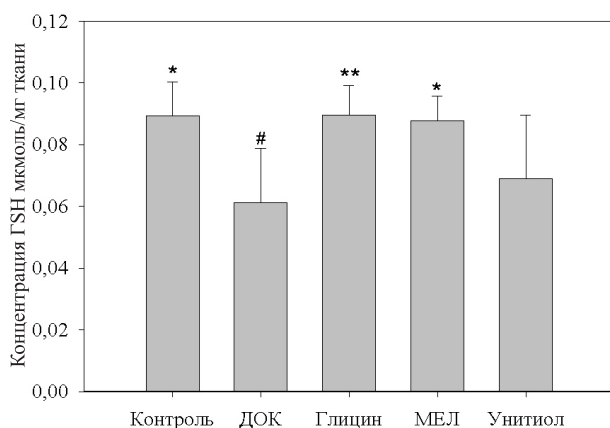


Рис. 1. Влияние доксорубина (ДОК) и совместного введения доксорубина с мелатонином (МЕЛ), глицином и унитиолом на концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) в гомогенате почечной ткани. * - статистически значимое различие с группой ДОК: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, # - статистически значимое различие с группой контроля: # - $p < 0,05$.

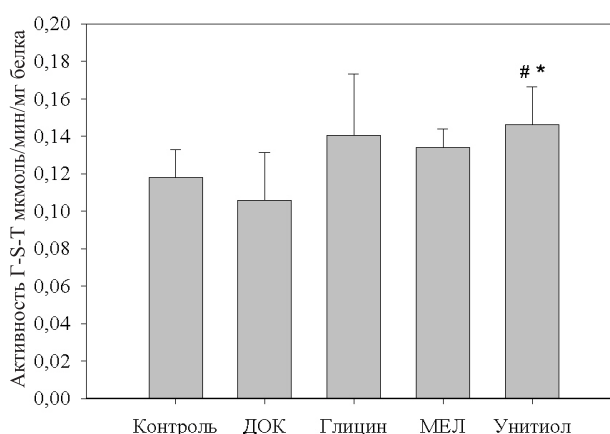


Рис. 4. Влияние доксорубина (ДОК) и совместного введения доксорубина с мелатонином (МЕЛ), глицином и унитиолом на активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) в гомогенате почечной ткани. * - статистически значимое различие с группой ДОК: * - $p < 0,05$, # - статистически значимое различие с группой контроля: # - $p < 0,05$.

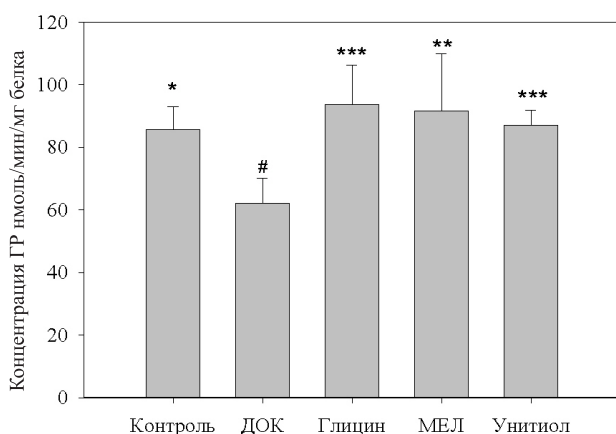


Рис. 2. Влияние доксорубина (ДОК) и совместного введения доксорубина с мелатонином (МЕЛ), глицином и унитиолом на активность глутатион редуктазы (ГР) в гомогенате почечной ткани. * - статистически значимое различие с группой ДОК: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$. # - статистически значимое различие с группой контроля: # - $p < 0,05$.

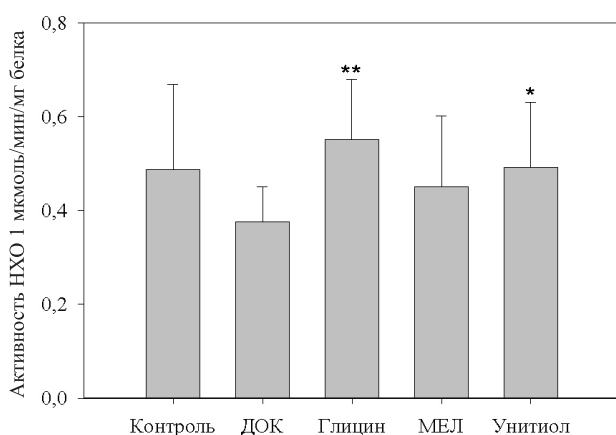


Рис. 3. Влияние доксорубина (ДОК) и совместного введения доксорубина с мелатонином (МЕЛ), глицином и унитиолом на активность НАД(Ф)Н: хинон оксидоредуктазы 1 (НХО1) в гомогенате почечной ткани. * - статистически значимое различие с группой ДОК: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Концентрацию глутатиона восстановленного (GSH) определяли в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой (ДНТБ) [17]. Навеску ткани растирали при 4° С в ступке с двумя 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 экстинкции 14,15 ммоль⁻¹см⁻¹. Количество GSH выражали в мкмоль на 1 мг ткани.

Концентрацию белка в пробах оценивали при помощи метода Бредфорда [18].

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 GSH в паренхиме почек представлены на рисунках 1–4. Как видно из рис. 1, доксорубин снижал содержание глутатиона восстановленного в паренхиме почек (GSH) по сравнению с контролем с $0,089 \pm 0,011$ до $0,061 \pm 0,017$ мкмоль/мг ткани ($p < 0,05$), т.е. почти на 30%. В группах животных, которым перед введением доксорубина вводили мелатонин и глицин, уровни глутатиона восстановленного в тканях почек не отличались от контрольной группы и были на 31% и 29 % выше по сравнению с группой ДОК ($p < 0,05$). Предварительное введение унитиола не предотвращало снижения содержания GSH.

В группе ДОК активность глутатион-редуктазы составляла $62,1 \pm 8,04$ нмоль/мин/мг белка, что ниже, чем в контрольной группе ($85,88 \pm 7,18$ нмоль/мин/мг белка) на 27% ($p < 0,05$). Введение мелатонина, глицина и унитиола перед инъекцией доксорубина предотвращало снижение активности ГР в почечной ткани (рис. 2).

Введение доксорубина не вызывало достоверных изменений активности НХО1. При совместном введении доксорубина с глицином активность НХО1 в тканях почек достоверно увеличивалась на 31,7 % по сравнению с группой ДОК, введение унитиола также приводило к увеличению активности НХО1 на 18% (рис. 3). Введение унитиола перед инъекцией ДОК приводило к достоверному повышению активности Г-S-T по сравнению как с группой контроля, так и с группой ДОК (рис.4).

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 МЕЛ – $3,41 \pm 1,37$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$), в группе глицин – $1,72 \pm 1,13$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$), в группе унитиол – $1,98 \pm 1,33$ мкмоль/мг белка ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Доксорубин является одним из самых широко используемых противоопухолевых препаратов [19] и в то же время одним из наиболее токсичных [3]. Снижение токсичности доксорубина потенциально может быть достигнуто несколькими путями: во-первых, за счет снижения дозы препарата, во-вторых, путем создания новых препаратов антрациклинового ряда с низкими показателями токсичности в отношении нормальных тканей; и в-третьих, за счет одновременного использования препаратов, блокирующих или значительно ослабляющих токсичность доксорубина [20]. К сожалению, все вышеперечисленные подходы до сих пор не принесли должного эффекта [21].

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 образованию гидроксильного радикала и инициации цепных реакций с вырожденным разветвлением [6]. Антрациклины могут способствовать высвобождению ионов Fe^{2+} из ферритина в результате взаимодействия с этим белком, либо опосредованно, через генерацию супероксид анион радикала [22], и тем

самым еще больше усугублять оксидативный стресс.

Второй механизм цитотоксичности доксорубина связан с его редокс-циклической активностью внутри клетки [23]. В основе этого механизма лежит способность флавиновых редуктаз (цитохром-Р-450-редуктаза, цитохром b_5 -редуктаза, НАДН-дегидрогеназа, ксантин-оксидаза) восстанавливать доксорубин из формы хинона до семихинона, т.е. осуществлять одноэлектронное восстановление антрациклина. Доксорубин 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 доксорубина (т.е. хинон) [5]. Цикл одноэлектронного восстановления/окисления доксорубина может функционировать достаточно продолжительное время и вызывать внутриклеточный оксидативный стресс [24], который приводит к снижению внутриклеточной концентрации ГSH и, как следствие, к снижению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала [25]. Установлено, что снижение внутриклеточной концентрации ГSH может запускать митохондриальный путь реализации апоптоза [7, 26]. В работах последних лет отмечается, что токсический эффект антрациклиновых антибиотиков в отношении нормальных тканей реализуется, в основном, через индукцию апоптоза [3, 8, 21].

Полученные нами данные свидетельствуют, что введение доксорубина крысам приводит к снижению концентрации ГSH в паренхиме почки, это согласуется с литературными данными [9]. Глицин и мелатонин препятствовали индуцированному доксорубином снижению ГSH в ткани почек, что является благоприятным эффектом. Механизмы, с помощью которых препараты восстанавливают содержание глутатиона, требуют дополнительного исследования. Известно, что мелатонин, помимо гормональной активности, обладает также антиоксидантными свойствами [27], причем его эффект зависит от концентрации препарата в плазме крови. В ряде работ установлено, что мелатонин способен увеличивать активность глутатион-зависимых ферментов [28], в том числе и в опытах с антрациклиновыми антибиотиками [9].

Положительным эффектом глицина является обнаруженная нами активация препаратом НАД(Ф)Н: хинон оксидоредуктазы 1, которая защищает клетки от токсического воздействия веществ хиноидной природы путем осуществления двухэлектронного восстановления хинонов до стабильных гидрохинонов. Такая реакция снижает воз-

можность одноэлектронного восстановления доксорубина до семихинона [29]. НХО1 обладает и рядом других защитных функций, например, поддерживает в восстановленном состоянии коэнзим Q_{10} – один из основных антиоксидантов мембран клеток [30], и восстанавливает α -токоферил гидрохинон в α -токоферол и участвует в детоксикации супероксид-анион радикала [31]. Увеличение активности НХО1 положительно отражается на способности клеток противостоять доксорубин-индуцированному оксидативному стрессу, тогда как снижение активности НХО1 вызывает повышенную чувствительность к веществам хиноидной природы, к которым относятся все антрациклиновые антибиотики [32].

Г-S-T и НХО-1 относятся к ферментам II фазы детоксикации, активность которых регулируется на уровне транскрипции. В ответ на попадание в клетку антиоксидантов и электрофильных соединений их активность возрастает [33]. Вероятно, этим можно объяснить возрастание активности Г-S-T и НХО-1 в ответ на введение унитиола совместно с доксорубином, однако, если судить по уровню ГSH, возрастание активности ферментов антиоксидантной защиты не смягчало индуцированный доксорубином оксидативный стресс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, глицин снижает доксорубин-индуцированный оксидативный стресс в тканях почек. Ключевым моментом протективного действия глицина является поддержание уровня восстановленного глутатиона. Мелатонин также обладает способностью снижать проявления доксорубин-индуцированного оксидативного стресса в почках путем восстановления уровня восстановленного глутатиона. При этом механизмы защитного действия препаратов, по-видимому, различны, в этой связи в будущем представляет интерес при доксорубин-индуцированной нефротоксичности исследовать возможность потенцирования протективного эффекта за счет совместного введения препаратов, обладающих различными антиоксидантными свойствами.

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sessa C. Anticancer agents. In: Cavalli F, Hansen HH, Kaye SB et al, eds. Textbook of Medical Oncology. Martin Dunitz, London, 1997;464-489
2. Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumor cells. *Biochem Pharmacol* 1993;46:375-382

3. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:1789-1792
4. Mazue G, Iatropoulos M, Imondi A et al. Anthracyclines: a review of general and special toxicity studies. *Int J Oncol* 1995;7:713-726
5. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986;261:3060-3067
6. Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J* 1999;13:199-212
7. Schafer QF, Buettner 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
8. Liu X, Chen Z, Chua CC et al. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H254-H263
9. 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
10. Senthilkumar R, Sengottuvelan M, Nalini N. Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocyte of rats with alcohol-induced liver injury. *Cell Biochem Funct* 2004;22:123-128
11. Shaikh ZA, Tang W. Protection against chronic cadmium toxicity by glycine. *Toxicology* 1999;132:139-146
12. Сабирова РА, Иноятова ФХ, Гаппаров ОС. Влияние SH-соединений на особенности изменения активности ферментов антиоксидантной защиты в различных тканях при остром панкреатите. *Эксп Клин Фармакология* 2000;3:33-35
13. Habig WG, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-7139
14. 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
15. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975;250:5475-5480
16. Levin RL, Garland D, Oliver CN. et al. Determination carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzym* 1990;186:464-478
17. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1972;82:70-77
18. 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
19. Herman EH, Ferrans VJ, Sanchez JA. Methods of reducing the cardiotoxicity of anthracyclines. In: Muggia FM, Green MD, Speyer JL., eds. *Cancer Treatment and the Heart*. The Johns Hopkins University, Baltimore, 1992:115-169.
20. Basser RL, Green MD. Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1993;19:57-77
21. Sun X, Zhou Z, Kang JY. Attenuation of doxorubicin toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer Res* 2001;61:3382-3387
22. Minotti G. Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1993;6:134-146
23. Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad Biol Med* 1989;6:63-101
24. Thornalley PJ, Dodd NJ. Free radical production from normal and adriamycin-treated rat cardiac sarcosomes. *Biochem Pharmacol* 1985;34:669-674
25. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000;267:4928-4944
26. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-2933
27. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free

radicals. *News Physiol Sci* 2000;15:246-250

28. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000;28:89-96

29. 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

30. Beyer RE, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S et al. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2528-2532

31. 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

32. Radjendirane V, Joseph P, Lee Y-H et al. Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem* 1998;273:7382-7389

33. Nguen T, Sherratt PJ, Pickett C. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:233-260.

Поступила в редакцию 13.09.2004 г.