

ЗМІНИ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ЩУРІВ З ДОКСОРУБІЦИН-ІНДУКОВАНОЮ КАРДІОПАТІЄЮ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ З АНТИОКСИДАНТНОЮ ДІЄЮ

Ю. А. Гордієнко¹, Я. Бакланова³, М. В. Коваленко², Л. М. Степченко²,
А. І. Шевцова¹, Г. О. Ушакова³

¹ДЗ «Дніпропетровська медична академія»

²Дніпропетровський державний аграрний університет

³Дніпропетровський державний університет ім. О. Гончара

Під дією антрациклінового антибіотику доксорубіцину змінюються фізіологічні та біохімічні показники у щурів: значно знижується індекс маси серця щурів, їх локомоторна активність, в плазмі крові підвищується активність АсАТ та ЛДГ, рівень холестерину та тригліцеридів, знижується концентрація загального білка та альбуміну. Показано позитивний вплив антиоксидантних препаратів — корвітину, α -кетоглутарату і гуміліду, на фізіологічний стан, локомоторну функцію та біохімічні показники плазми крові за умов доксорубіцин-індукованої кардіопатії у щурів.

Ключові слова:АНТРАЦИКЛІНОВІ АНТИБІОТИКИ, ДОКСОРУБІЦИН, КАРДІОПАТІЯ, АНТИОКСИДАнти, КОРВІТИН, α -КЕТОГЛУТАРАТ, ГУМІЛІД

Доксорубіцин (ДР) є одним із основних лікарських препаратів антрациклінового ряду, що використовуються при лікуванні онкологічних захворювань у людини та тварин. Застосування цього препарату при раку молочної залози у собак призводить до збільшення тривалості життя у 2,5 раза порівняно з тваринами, що отримували тільки хірургічне лікування. Однак ДР, як і інші антрациклінові антибіотики, проявляє високу цитотоксичність, що обмежує його застосування. Найбільш важким ускладненням ДР-терапії є ушкодження міокарду, часто з летальним кінцем, тому розробка засобів протекції кардіоваскулярних ускладнень при антрацикліновій терапії є актуальною задачею [1].

Останнім часом з'явилося багато досліджень, присвячених пошуку препаратів, що зменшують токсичність ДР, серед яких є речовини з антиоксидантною дією. Так, використання ДР у комплексі із антиоксидантом декстразоксаном призводило до зниження шкідливої дії ДР [2]. Поряд з тим, є дані, що окремі антиоксиданти не проявляють суттєвого захисного ефекту щодо цитотоксичності ДР [3].

Метою цієї роботи було визначення впливу різних за походженням та механізмом дії препаратів з антиоксидантними властивостями на фізіологічні та метаболічні показники у щурів з ДР-індукованою кардіопатією. У якості таких препаратів були використані біофлавоноїд корвітин, центральний метаболіт циклу трикарбонових кислот — α -кетоглутарат (АКГ) та препарат гумінової природи з торфу-гумілід. Перший широко використовують у кардіологічній практиці при лікуванні інфаркту міокарду [4], другий — як препарат, що поліпшує енергозабезпечення клітин [5], а третій — як імуномодулятор та адаптоген з антиоксидантними властивостями [6, 7]. У той же час, всі ці препарати мають властивості антиоксидантів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар вагою 210±50 г. Тварин було поділено на 5 груп по 8 особин у кожній. До першої групи увійшли контрольні тварини, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину, у всіх інших була використана модель кардіопатії (КП): щотижнево протягом чотирьох тижнів щурам вводили ДР у дозі 1 мг/кг. Інших тварин розділили наступним чином: 2 група — тварини з індукованою КП, 3 група отримувала

корвітин (Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна) внутрішньочеревно в дозі 5 мг/кг за 30–60 хвилин перед введенням доксорубіцину, 4 і 5 — отримували ДР щотижня та α -кетоглутарат (0,5 % Са-АКГ+0,5% Na-АКГ) або гумілід (0,01 %, ТУ У 15.7-00493675-004 2009) з питною водою протягом всього експерименту відповідно до груп. Щодня тварини 4 групи вживали 43 мл питної рідини на 1 кг ваги, тварини 5 групи — 49 мл/кг. Тварини утримувалися за умов стандартного віварію із циклічністю світла 12 годин. Протягом експерименту один раз на тиждень у тварин реєстрували вагу тіла та поведінкові реакції у відкритому полі за методикою Буреша [8].

Після закінчення 5 тижня експерименту всіх тварин декапітували з використанням тіопенталу натрію в дозі 60 мкг/кг згідно з вимогами Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Оцінювання біохімічних показників в плазмі крові проводили за допомогою тест-наборів Elitechdiagnostics (Seppim S. A. S., Франція) на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі ВА-88 Mindray (Китай). Матеріалом досліджень були зразки плазми крові експериментальних тварин. Активності АлАТ, АсАТ і КК-МВ визначали відповідними оптимізованими кінетичними методами, ЛДГ — за допомогою методу, що базується на оптичному тесті Варбурга з використанням у якості субстрату L-лактату. Кількісна оцінка холестерину та тригліцеридів проводилась ферментативно-колориметричними методами по кінцевій точці. Біуретовий метод використовували для дослідження загального білку, колориметричний метод з бромкрезол зеленим — для визначення альбуміну. Всі аналізи проведено згідно інструкцій до наборів реактивів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента та U-критерій Уїлкоксона (Манна-Уїтні). Вірогідними вважали результати, якщо $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення

Для проведення експерименту з розвитку кардіотоксичності групи тварин були розподілені за вагою. Згідно з деякими джерелами, маса тварин при використанні антрациклінових антибіотиків значно знижується, тому для експериментальних груп з ДР-індукованою КП були відібрані тварини з більшою масою тіла. Середня маса тварин у цих групах на початку експерименту склала 244 ± 11 г. Тварини контрольної групи на початку експерименту мали, в середньому, вагу 168 ± 5 г. Реєстрація маси тіла протягом експерименту показала відсутність суттєвих змін ваги тіла піддослідних щурів (рис. 1).

Була зареєстрована тенденція до збільшення ваги тіла тварин контрольної групи протягом 4 тижнів. У тварин, що отримували ДР з різними протоколами використання антиоксидантних препаратів вага тіла не змінювалась чи мала тенденцію до зниження, але різниця була невірогідною. Інша картина спостерігалась за визначенням індексу маси серця по відношенню до загальної ваги експериментальних щурів. Якщо у контрольній групі цей показник дорівнював 5,93 %, то за умов КП він знижувався до 4,81 %. Застосування антиоксидантних препаратів призводило до збільшення індексу і складало 5,69 %, 5,21 % та 4,92 % у 3, 4 та 5 групах відповідно.

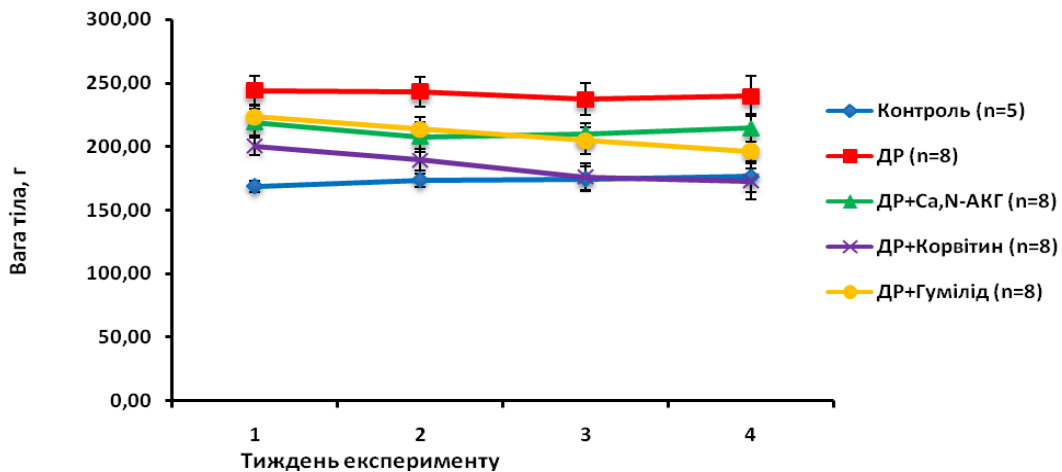


Рис. 1. Вага тіла щурів протягом експерименту

Оцінка локомоторної активності щурів за методикою Буреша показала, що за умов введення ДР має місце вірогідне ($p \leq 0,05$) зниження активності тварин до 42 % відносно контрольної групи (рис. 2).

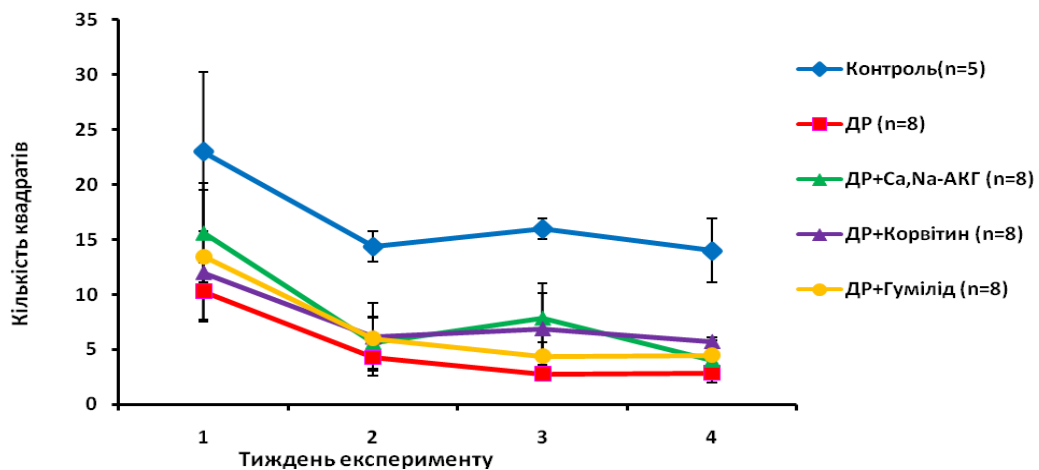


Рис. 2. Локомоторна активність щурів у досліджуваних групах

Використання протекторних речовин (корвітину, Са-АКГ, Na-АКГ та гуміліду) призводило до поліпшення локомоторної активності дослідних тваринна 12–19 %. Таким чином, незважаючи на зниження загальної маси тіла тварин в експериментальних групах 3 та 4, наведені вище результати свідчать про кардіо- та нейропротекторну дію досліджуваних речовин.

Наявність КП була підтверджена за результатами дослідження активності серцево-специфічних ферментів (табл. 1). Як видно з таблиці, КП у щурів супроводжується низкою біохімічних змін. Вірогідне підвищення активності АсАТ і ЛДГ в 1,3 та 2 рази, відповідно, свідчить про ураження кардіоміоцитів. У той же час, активність АЛАТ майже не змінювалась. Враховуючі тканинну локалізацію амінотрансфераз, логічно припустити, що ДР не призводить ушкодження печінки, а впливає, переважно, на кардіоміоцити, що було підтверджено результатами патоморфологічних досліджень.

Таблиця 1

Активність ферментів у плазмі крові досліджуваних груп щурів

Група	АлАТ, МО/л	АсАТ, МО/л	ЛДГ, МО/л	КК-МВ, МО/л
Норма (фізіологічний розчин)	61,3±6,1	145,3±13,1	640,0±65,2	710,1±99,1
Доксорубіцин	57,4±3,3	184,4±3,8**	1168,1±51,5***	748,8±47,4
Доксорубіцин + корвітин	54,1±1,8	135,5±8,7 ^{§§§}	541,3±11,6 ^{§§§}	550,4±60,0 [§]
Доксорубіцин + α-кетоглутарат	57,9±3,0	158,0±6,4 ^{§§}	653,4±30,1 ^{§§§}	717,2±59,7
Доксорубіцин + гумілід	53,1±2,4	163,4±7,2 [§]	1514,2±59,6 ^{§§§}	745,4±29,5

Примітка: * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, *** — $p \leq 0,001$ — вірогідна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи, § — $p \leq 0,05$, §§ — $p \leq 0,01$, §§§ — $p \leq 0,001$ — вірогідна різниця по відношенню до групи з індукованою кардіопатією

Що стосується серцевоспецифічної МВ-форми креатинкінази, то відсутність вірогідних змін активності цього ферменту у всіх досліджуваних тварин, крім 3 групи, свідчить про хронізацію процесу через 4 тижні введення ДР. Відомо, що активність КК-МВ відображає початкові стадії ішемічного ураження серцевого м'язу (12–24 години). Через 72 години після нападу активність КК-МВ знижується практично до нормальних значень [9]. Вірогідне зниження активності цього ферменту за умов застосування корвітину може бути результатом інгібування цього ферменту продуктами метаболізму корвітину [10].

У тварин, які разом з ДР отримували антиоксиданти, спостерігалось вірогідне зниження, або тенденція до зниження активності всіх означених вище ферментів у порівнянні з 2 групою. Парадоксальним є вірогідне підвищення активності ЛДГ на тлі застосування гуміліду, причому різниця вірогідна по відношенню до групи з індукованою КП. На даному етапі це важко пояснити. Вочевидь, необхідні додаткові дослідження активності ферментів у серцевому м'язі. В цілому отримані в роботі дані доводять, що застосування антиоксидантів призводить до зменшення шкідливої дії ДР.

За даними літератури ДР напряму впливає на кількість загального білку та його фракційний склад у плазмі крові [11]. За нашими даними, вміст білку у плазмі крові при КП вірогідно знижується (табл. 2), що пояснюється підвищенням швидкості розпаду білків або гальмуванням їх синтезу при даній патології. Враховуючи, що більша частина білків плазми синтезується у печінці, було визначено вміст альбуміну і встановлено, що кількість його вірогідно знижується при КП і не відновлюється при застосуванні досліджуваних в цій роботі препаратів. Виключення склали тварини 4 групи, у яких спостерігалась тенденція до відновлення рівня альбуміну до нормальних значень. Слід зазначити, що у тварин всіх груп зберігається приблизно однакове співвідношення альбуміну та загального білка. Воно коливається у межах 0,47–0,48. Вищенаведені дані пропорційно відображаються і на значеннях рівня сечовини, як кінцевого продукту білкового обміну. Підвищення рівня сечовини у плазмі тварин 3-ї групи на тлі зменшення загального білку та альбуміну свідчить про перевагу процесів катаболізму. Навпаки, у тварин 5-ї групи активуються процеси синтезу окремих білків (але не альбуміну), бо саме у них має місце підвищення концентрації загального білку на тлі зниження рівня сечовини.

Таблиця 2

Показники білково-ліпідного обміну у плазмі крові досліджуваних груп щурів

Група	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Сечовина, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Тригліцериди, ммоль/л
Норма (фізіологічний)	62,0±0,9	30,2±1,1	5,4±0,5	1,39±0,14	0,28±0,05

розчин)					
Доксорубіцин	55,4±1,8***	25,6±0,9*	5,4±0,3	2,49±0,18**	3,04±0,33***
Доксорубіцин + корвітин	48,3±1,9 ^{§§}	23,1±1,8	6,4±0,5	2,72±0,35	2,44±0,34
Доксорубіцин + α-кетоглутарат	47,0±1,8 ^{§§}	27,1±1,5	5,4±0,2	3,42±0,49	5,17±0,72 ^{§§}
Доксорубіцин гумілід	52,4±0,6	21,7±1,0 ^{§§}	3,3±0,4 ^{§§§}	2,01±0,26	2,62±0,69

*Примітка:** — p≤0,05, ** — p≤0,01, *** — p≤0,001 — вірогідна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи, § — p≤0,05, §§ — p≤0,01, §§§ — p≤0,001 — вірогідна різниця по відношенню до групи з індукованою кардіопатією

За результатами наших досліджень у щурів з ДР-індукованою кардіопатією відбувається різке підвищення рівня холестерину та тригліцеридів (ТГ) у порівнянні з нормою (табл. 2). Застосування корвітину та гуміліду призводило до незначного зменшення концентрації цих показників, а α-кетоглутарат, навпаки, призводив до їх збільшення, особливо ТГ. Можна припустити, що АКГ, поліпшуючи енергетичне забезпечення клітин, опосередковано впливає на синтез холестерину і тригліцеридів.

Висновки

Під дією антрациклінового антибіотику доксорубіцину практично не змінюється маса тіла, але значно знижується індекс маси серця щурів, їх локомоторна активність; в плазмі крові підвищується активність АсАТ та ЛДГ, рівень холестерину та тригліцеридів при одночасному зниженні концентрації загального білка та альбуміну. Застосування корвітину, α-кетоглутарату та гуміліду призводить до покращення фізіологічних та біохімічних показників у щурів з доксорубіцин-індукованою кардіопатією.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення молекулярних механізмів кардіо- та нейропротекторної дії корвітину, α-кетоглутарату та гуміліду.

Iu. Gordiienko, Ia. Baklanova, M. Kovalenko, L. Stepchenko, A. Shevtsova, G. Ushakova

CHANGES OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS WITH DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOPATHY UNDER INFLUENCE OF SUBSTANCES WITH ANTIOXIDANT ACTION

Summary

Physiological and biochemical parameters change under the influence of doxorubicin in rats: significantly reduces heart weight index of rats and their locomotive function, increases the activity of AST and LDH, levels of cholesterol and triglycerides, decrease the concentrations of total protein and albumin. It is shown positive effects of antioxidant substances corvitin, α-ketoglutarate and humilid on physiological state, locomotive function and biochemical parameters in rats with doxorubicin-induced cardiopathy.

Ю. А. Гордиенко, Я. Бакланова, М.А. Коваленко, Л. М. Степченко, А. И. Шевцова, Г. А. Ушакова

ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРЫС С ДОКСОРУБИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ КАРДИОПАТИЕЙ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ

Аннотация

Под действием доксорубина изменяются физиологические и биохимические показатели у крыс: значительно снижается индекс массы сердца, их локомоторная активность, в плазме крови повышается активность АсАТ и ЛДГ, уровень холестерина и триглицеридов, снижается концентрация общего белка и альбумина. Показано положительное влияние антиоксидантных препаратов — корвитина, α -кетоглутарата и гумилида, на физиологическое состояние, локомоторную функцию и биохимические показатели плазмы крови при доксорубин-индуцированной кардиопатии у крыс.

1. *Непомнящих Л. М.* Влияние препаратов с противоопухолевой активностью — доксорубина и циклофосфана — на структурную реорганизацию миокарда крыс и численность кардиомиоцитов / Л. М. Непомнящих, Е. Л. Лушникова, М. Г. Клиникова, О. П. Молодых // Сибирский онкологический журнал. — 2011. — № 4 (46). — С. 30–35.

2. *Чекман И. С.* Препараты метаболического действия в кардиологии / И. С. Чекман, Н. А. Горчакова // Лікування і діагностика. — 2003. — № 4. — С. 52–56.

3. *Parabathina R. K.* Sree1Role of certain flavonoids and vitamin-E against doxorubicin-inducedoxidative stress / R. K. Parabathina, E. Muralinath, P. L. Swamy et al. // J. Chem. Pharm. Res. — 2011. — Т. 2, № 3. — С. 816–834.

4. *Min Q.* Protective effects of hawthorn leaves flavonoids on cultured myocardial cells subjected to anoxia/reoxygenation injury in neonatal rats / Q. Min, Yu.Bai et al. // Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica. — 2011. — 01.

5. *Dakshayani K. B.* Alpha-ketoglutarate modulates the circadian patterns of lipid peroxidation and antioxidant status during N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats / K.B. Dakshayani, P. Subramanian // J Med Food. — 2006. — 9. — P. 90–97.

6. *Степченко Л. М.* Роль гидрогумата как адаптогена в развитии стресс-реакции у лабораторных животных / Л. М. Степченко, Г. В. Наумова, Т. Ф. Овчинникова, Н. Л. Макарова// Природопользование. — 2009. — № 15. — С. 241–244.

7. *Степченко Л. М.* Стан системи антиоксидантного захисту еритроцитів курей-несучок за дії гумінових речовин / Л. М. Степченко, М. В. Скорик // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів і кормових добавок. — Львів, 2006. — Вип. 7, № 3, 4. — С. 137–143.

8. *Буреш Я.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П Хьюстон. — М. : Высшая школа, 1991. — 352 с.

9. *Назаренко Г. И.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. — М. : Медицина, 2002. — 541 с.

10. *Makris D. P.* An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols / D. P. Makris, J. T. Rossiter // Food Chem. — 2002. — Vol. 77, № 2. — P. 177–185.

11. *Малоштан Л. М.* Вплив екстракту сої на концентрацію білків плазми крові на фоні доксорубинової кардіоміопатії (ДКМП) / Л. М. Малоштан, Р. Ф. Єрьоменко, О. М. Шаталова, Н. П. Субота // Український біофармацевтичний журнал. — 2009. — Т. 1, № 3. — С. 39–43.

Рецензент: докторант, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Гавриляк В. В.