

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА БАЛАНС МАКРО- И МИКРО-ЭЛЕМЕНТОВ И ИНДИКАТОРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

УДК 577.118; 577.115.4

¹**Ибрагимова М.Я.**: старший научный сотрудник кафедры фундаментальной и клинической фармакологии, к.б.н.;

²**Скальный А.В.**: Председатель ОСОО «Российское общество медицинской элементологии», д.м.н., профессор;

⁴**Валеева И.Х.**: старший научный сотрудник, д.б.н.;

²**Скальная М.Г.**: врач, д.м.н.;

³**Сабирова Л.Я.**: исполнительный директор.

^{1,5}**Жданов Р.И.**: главный научный сотрудник, профессор кафедры фундаментальной и клинической фармакологии, д.х.н.;

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Республика

²ОСОО «Российское общество медицинской элементологии», г. Москва, Россия

³ООО «Золотой Лотос», г. Казань, Республика

⁴Казанский государственный медицинский университет, г. Казань

⁵НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва, Россия

EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMIDE ON THE BALANCE OF MACRO- AND MICRONUTRIENTS, AND INDICATORS OF LIPID PEROXIDATION

Ibragimova M.Ja; Skal'nyj AV; Valeeva IH; Skal'naja MG; Sabirova LJ; Zhdanov RI

Введение

Лекарственные препараты, используемые в клинике для терапии, например, онкозаболеваний (циклофосфамид, ЦФ) могут оказывать воздействие на системы и функции организма, в том числе, на баланс макро- и микроэлементов и системы биоантиоксидантной защиты, регулирующие уровень свободных радикалов в организме [3, 5]. Канцеростатик ЦФ обладает широким спектром противоопухолевой активности и используется для химиотерапии при мелкоклеточном раке легкого, яичников, молочной железы, шейки и тела матки, мочевого пузыря, простаты и при нейроblastомах [13]. ЦФ и его активные метаболиты проявляют мутагенные и цитотоксические эффекты в тканях организма [3, 13]. Мутагенные эффекты ЦФ широко известны и подтверждены наблюдением хромосомных aberrаций, в частности, в клетках костного мозга или микроядер в эритроцитах периферической крови мышей [3]. Влияние ЦФ на уровень макро- и микроэлементов в органах в комплексе с индикаторами перекисного окисления липидов (ПОЛ) еще недостаточно изучено. В последние годы активно исследуется роль баланса макро- и микроэлементов в организме в поддержании здоровья и в патогенезе различных заболеваний [6, 9–12, 16–19]. Данные о содержании микроэлементов в органах под влиянием лекарственных средств могут дать информацию об активности ферментных систем антиоксидантной защиты, а уровень индикаторов ПОЛ – об активности ПОЛ в биомембранах. ПОЛ принадлежит значительная роль в метаболизме, в поддержании постоянства внутренней среды организма и его адаптационных реакций [14, 15, 20, 21]. В физиологических условиях свободнорадикальные процессы находятся под контролем ферментативных и неферментативных систем антиоксидантной защиты. При патогенезе или при действии ксенобиотиков, в частности, лекарствен-

ных средств, они могут выйти из под контроля систем антиоксидантной защиты. Это может привести к генерации активных форм кислорода, активации свободнорадикальных процессов, распаду метаболитов или гибели клетки [1, 14, 15, 21]. Активация свободнорадикальных реакций и ПОЛ рассматриваются как факторы индукции апоптоза, роста опухолей и многих других звеньев патогенеза заболеваний [4, 15, 21]. Методы определения индикаторов ПОЛ хорошо известны [1, 4]. В литературе, однако, имеется недостаточно сведений о влиянии канцеростатиков, в частности, ЦФ, на параметры ПОЛ и на баланс макро- и микроэлементов в органах экспериментальных животных и человека [3, 4, 7]. Влияние ЦФ на уровень жизненно необходимых микроэлементов в комплексе с индикаторами ПОЛ в эксперименте было исследовано нами ранее [6].

Целью данной работы является комплексное изучение влияния циклофосфамида на баланс макроэлементов, условно жизненно необходимых и токсичных элементов, а также на уровень индикаторов ПОЛ через 24 часа после однократного внутривенного введения в широком интервале доз. Это исследование позволит получить информацию о том, насколько организм восстанавливается после приема этого канцеростатика.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на 48 белых беспородных лабораторных крысах обоих полов, в каждой группе по 8 крыс, по 4 самки и 4 самца, массой 230–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария и на стандартной диете. Первая группа – интактные, вторая группа – контрольная – вводили внутривенно, однократно стерильную воду для инъекций. Животным 3-й – 6-й групп в том же режиме вводили внутривенно, однократно циклофосфамид в дозах 20, 40, 60 и 80 мг/кг.

Все реактивы и реагенты были марки ЧДА (чистые для анализа) или ХЧ (химически чистые). Для приготовления растворов циклофосаида и для контрольного варианта использовали стерильную «воду для инъекций» (ОАО «Новосибхимфарм», г. Новосибирск) в ампулах. В работе исследовали влияние противоопухолевого лекарственного средства циклофосаида (ЦФ, АО «Биохимик» г. Саранск) [8]. Для исключения влияния сезонных колебаний на изучаемые показатели основные исследования были выполнены в зимний период. Животных декапитировали через сутки под легким эфирным наркозом, быстро извлекали органы, которые замораживали с помощью жидкого азота. В изъятых органах определяли содержание макро- и микроэлементов и индикаторы перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновые конъюгаты (ДК) и малоновый диальдегид (МДА) [1, 4].

Содержание макро и микроэлементов определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на спектрометре Optima 2000 DV (PerkinElmer, США) в Центре биотической медицины, Москва, в головном мозге, почках и печени белых лабораторных крыс после внутрибрюшинного однократного введения ЦФ (40 мг/кг) и выражали в мкг/г [5, 10, 12]. Исследовали содержание пяти макроэлементов: кальций, фосфор, калий, натрий, магний; шести условно жизненно необходимых элементов: бор, кремний, никель, ванадий, мышьяк, литий и десяти токсичных элементов: олово, серебро, стронций, алюминий, свинец, кадмий, ртуть, бериллий, сурьма, лантан.

Индикаторы ПОЛ. В изъятых органах – головном мозге, сердце, печени, почках, надпочечниках, селезенке и тимусе крыс определяли уровень индикаторов ПОЛ – ДК и МДА. Уровень ТБК-взаимодействующих продуктов (МДА) оценивали в органах в присутствии тиобарбитуровой кислоты [1,4].

Статистический анализ. Оценка содержания макро- и микроэлементов и индикаторов ПОЛ проводили с использованием медианы. Нижний и верхний пороговые уровни определяли как 2,5-й и 97,5-й перцентили, соответственно [2]. В работе использовали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В наших экспериментах показано, что при сравнении содержания макро- и микроэлементов и индикаторов ПОЛ – ДК и МДА – в органах крыс в интактной и контрольной группах достоверно не отличались. Поэтому в дальнейших экспериментах в качестве контроля мы использовали только одну контрольную группу – животных, которым была введена стерильная вода для инъекций. На следующем этапе нами было исследовано содержание макро и микроэлементов и продуктов ПОЛ через 24 часа после однократного внутрибрюшинного введения ЦФ. Содержание макро и микроэлементов определяли при введении ЦФ в дозе 40 мг/кг (данные приведены только для кадмия, Рис. 1), а индикаторов ПОЛ – в дозах 20, 40, 60 и 80 мг/кг (данные приведены только для дозы 60 мг/кг, Рис. 2 и 3).

Микроэлементы и ЦФ. Любое отклонение в здоровье биологического организма сопровождается дисбалансом макро- и микроэлементов [5, 9, 10]. Стабильность химического состава является одним из важнейших и обязательных условий нормального функционирования организма. Дефицит жизненно важных микроэлементов (селена, цинка, йода, марганца и др.) в организме или повышенная концентрация токсичных микроэлементов (ртути, свинца, мышьяка, сурьмы, кадмия и др.) в окружающей среде приводят к неблагоприятным последствиям для жизнедеятельности человека [10, 11, 19], в частности, к росту числа онкологических, аутоиммунных и дегенеративных заболеваний, заболеваний лимфатической системы, инфекционных патологий [5, 7, 17].

Главной функцией макроэлементов является построение тканей, поддержание постоянства осмотического давления, ионного и кислотно-основного состава [10, 11]. Для каждого элемента существует оптимальный диапазон концентраций для осуществления жизненно важных функций. При дефиците или избыточном накоплении элементов в организме могут происходить серьезные изменения, связанные с нарушением активности зависящих от них ферментов [5, 7, 10, 11, 16]. При срыве механизмов метаболической компенсации, то есть возникновении дисрегуляции, экзогенный дисэлементоз превращается в дисрегуляционный,

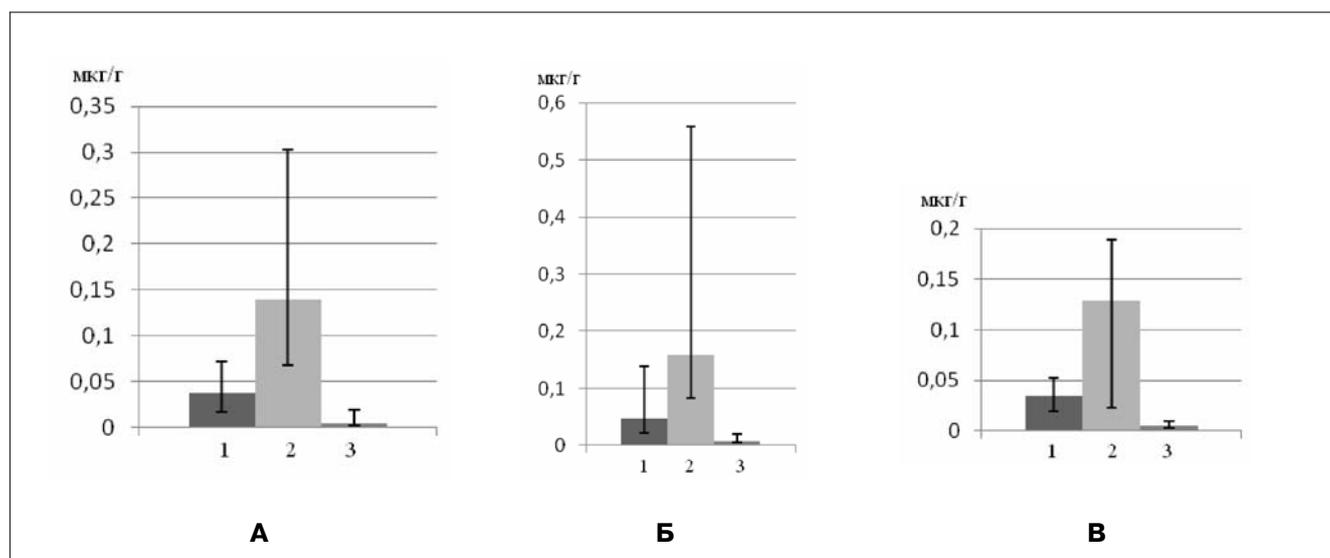


Рисунок 1. Содержание кадмия (ордината, мкг/г) в головном мозге (А), печени (Б) и почках (В) крыс после внутрибрюшинного однократного введения циклофосаида (40 мг/кг). Первый столбик: контроль – интактные, второй столбик: контроль – вода, третий столбик – циклофосаид.

что приводит к переходу состояния предболезни в болезнь как стойкую, почти необратимую дисрегуляцию на системном уровне [5, 9, 11, 17]. Экзогенный дефицит до наступления этого периода проявляется только на молекулярном и клеточном уровне, а впоследствии – на тканевом, органном и организменном уровнях [11].

Из наших результатов и данных, приведенных на рис. 1, следует, что после однократного введения ЦФ (40 мг/кг) в исследованных органах – головном мозге, печени и почках – содержание пяти макроэлементов: кальция, фосфора, калия, натрия и магния, шести условно жизненно необходимых элементов: бора, кремний, никель, ванадий, мышьяк, литий и девяти токсичных элементов: олово, серебро, стронций, алюминий, свинец, ртуть, бериллий, сурьма, лантан не изменяется по сравнению с контрольной группой крыс. Исключение составляют мышьяк (условно жизненно необходимый элемент) содержание которого достоверно уменьшается в почках и кадмий (токсичный микроэлемент) содержание которого достоверно уменьшается во всех исследованных органах (рис. 1).

Циклофосфамид и ПОЛ. Развитие многих заболеваний рассматривается и с позиций мембранной патологии клетки [4, 14]. Одним из универсальных механизмов повреждения мембран является ПОЛ. В норме процесс свободнорадикального окисления удерживается на относительно низком стационарном уровне, благодаря присутствию в тканях биоантиоксидантов и нейрогуморальных регуляторных систем. Изменения их содержания и активности могут являться причинами усиления, либо ингибирования процессов ПОЛ [15, 20]. В связи с этим необходим надежный, легко воспроизводимый тест для определения продуктов ПОЛ. При перекисном окислении полиненасыщенных высших жирных кислот образуются молекулы с двумя сопряженными двойными связями (диеновые конъюгаты, ДК – первичные продукты ПОЛ), что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения – 233 нм; (молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [1, 4].

Наиболее простым и адекватным способом оценки уровня ПОЛ является тест с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Известно, что ТБК может реагировать с липидами, аминокислотами, углеводами, однако основным продуктом, реагирующим с ТБК, является МДА – вторичный продукт ПОЛ, образующийся при переокислении полиненасыщенных жирных кислот, имеющих 2–3 диеновые связи [1, 4]. Для получения представления об интенсивности свободнорадикальных реакций ПОЛ в органах животных мы определяли содержание ДК и уровень одного из наиболее важных конечных продуктов ПОЛ – МДА в гомогенатах органов крыс. Активация ПОЛ, регистрируемая реакцией с тиобарбитуровой кислотой, как универсальный механизм повреждения, показана практически при всех патологических процессах в эксперименте и клинике [1, 4, 15, 21]. ПОЛ активируется при действии некоторых лекарственных средств, трансформирующихся в ходе реакций биотрансформации в свободные радикалы, что лежит в основе их токсического действия [3, 20].

В работе показано, что при введении ЦФ во всех исследованных дозах и во всех изученных органах крыс – сердце, печени, почках, надпочечниках и селезенке – уровень ДК и МДА достоверно не изменились (рис. 2). Исключение составляют тимус, в котором ЦФ достоверно увеличивает содержание ДК при концентрациях 60 и 80 мг/кг (Рис. 3) и головной мозг, в котором ЦФ в дозе 80 мг/кг достоверно увеличивает уровень МДА (данные не приведены).

Таким образом, в нашей работе показано, что циклофосфамид не изменяет содержание макроэлементов, условно жизненно необходимых и токсичных микроэлементов. Исключение составляют мышьяк и кадмий – содержание которых уменьшается: As в почках и Cd во всех исследованных органах – головном мозге, печени и почках. Циклофосфамид в исследованных дозах не оказывает влияние на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в изученных органах крыс.

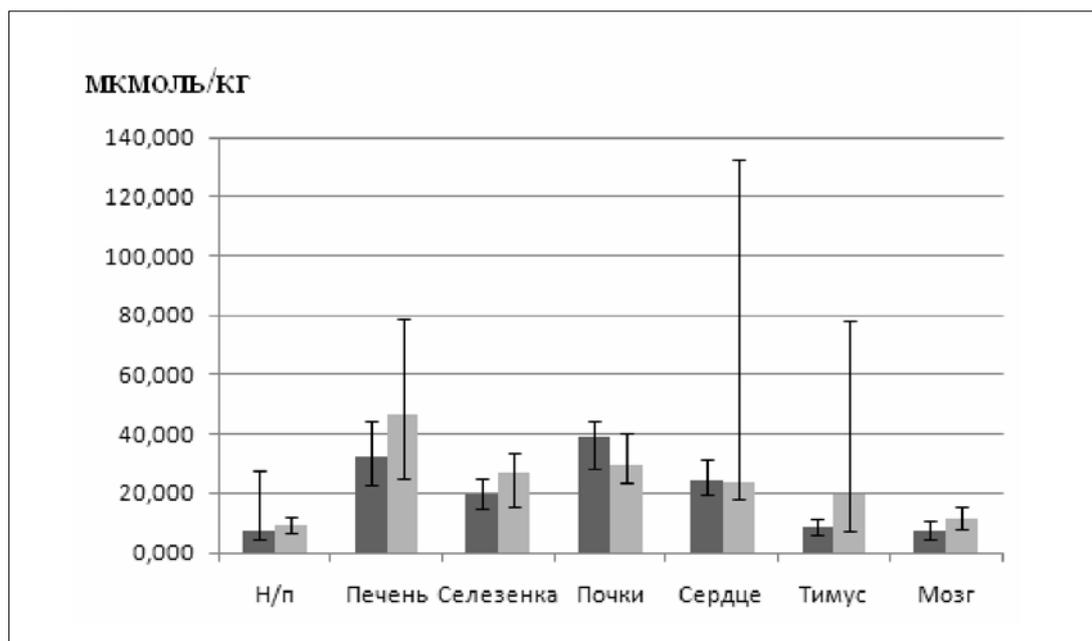


Рисунок 2. Содержание малонового диальдегида (ордината, мкмоль/кг) в органах крыс после внутрибрюшинного однократного введения циклофосфамида (60 мг/кг). Левый столбик: контроль – вода, правый столбик: циклофосфамид. Н/п – надпочечники.

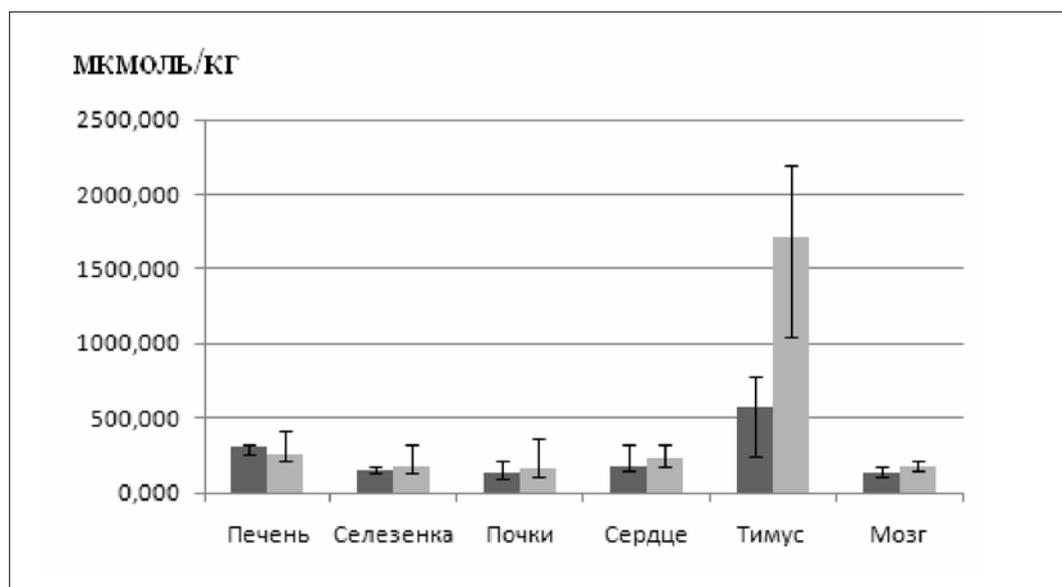


Рисунок 3. Содержание диеновых конъюгатов (ордината, мкмоль/кг) в органах крыс после внутрибрюшинного однократного введения циклофосфамида (60 мг/кг). Левый столбик: контроль – вода, правый столбик: циклофосфамид.

Выводы

1. Циклофосфамид в исследованных органах – головном мозге, печени и почках – не изменяет содержание пяти макроэлементов: кальция, фосфора, калия, натрия и магния, шести условно жизненно необходимых элементов: бора, кремний, никель, ванадий, мышьяк, литий и девяти токсичных элементов: олово, серебро, стронций, алюминий, свинец, ртуть, бериллий, сурьма, лантан по сравнению с контрольной группой крыс. Исключение составляют мышьяк (условно жизненно необходимый элемент) содержание которого достоверно уменьшается в почках и

кадмий (токсичный микроэлемент) содержание которого достоверно уменьшается во всех исследованных органах.

2. Циклофосфамид в исследованных дозах 20, 40, 60 и 80 мг/кг не влияет на перекисное окисление липидов в сердце, печени, почках, надпочечниках и селезенке крыс. Исключение составляют тимус, в котором циклофосфамид достоверно увеличил содержание диеновых конъюгатов при концентрациях 60 и 80 мг/кг и головной мозг, в котором циклофосфамид в дозе 80 мг/кг достоверно увеличил уровень малонового диальдегида.

Работа выполнена в Центральной научно-исследовательской лаборатории Казанского государственного медицинского университета (КГМУ) и Казанском (Приволжском) федеральном университете. Авторы благодарят профессора В.В. Семенова (КГМУ), сотрудников ЦНИЛ КГМУ, а также выпускников КГУ К.У. Перес Бук, Р. Моралес, Г.А. Шайхуллиной и А.В. Гильман, за помощь в проведении экспериментов по определению индикаторов ПОЛ. Работа поддержана ЦНИЛ КГМУ, Центром биотической медицины, г. Москва и грантами КФУ 2011 г. Ф11-02 и КФУ/Минобрнауки РФ 2012–2014 г.г. № бюджет 12–26.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валеева И.Х., Ибрагимова М.Я., Жданов Р.И. и др. Методы определения содержания продуктов перекисного окисления липидов в биологическом материале: учебно-методическое пособие. – Казань: Изд-во Казанск. гос. ун-та, 2008. – 26 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Дурнев А.Д. Генетическая токсикология // Вестник Рос. Акад. мед. наук, 2011. – № 9. – С. 35–43.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс, 2001. – 343 с.
5. Ибрагимова М.Я., Сабирова Л.Я., Березкина Е.С. и др. Взаимосвязь дисбаланса макро- и микроэлементов и здоровье населения (обзор литературы) // Казанский медицинский журнал, 2011. – Т. 92, № 4. – С. 606–609.
6. Ибрагимова М.Я., Скальный А.В., Валеева И.Х. и др. Содержание жизненно необходимых микроэлементов и продуктов перекисного окисления липидов в органах как результат действия лекарственных препаратов // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. – 2012, № 2.
7. Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.А., Скальная М.Г. Иммунофармакология микроэлементов. – М.: КМК, 2000. – 456 с.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х томах. Т. 2. – М.: Медицина, 1985. – С. 298–299, 433–434.
9. Некрасов В.И., Скальный А.В. Элементный статус лиц вредных и опасных профессий. – М.: РОСМЭМ, 2006. – 229 с.
10. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. Под ред. А.В. Скального. – СПб.: Наука, 2008. – 544 с.
11. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – Москва: Издательский дом Оникс 21 век: Мир, 2004. – 216 с.
12. Скальный А.В., Лакарова Е.В., Кузнецов В.В., Скальная М.Г. Аналитические методы в биоэлементологии / под ред. А.В. Скального, С.П. Нечипоренко. – СПб.: Наука, 2009. – 264 с.
13. Справочник-путеводитель практикующего врача: Лекарственные средства / Под ред. Р.В. Петрова (гл. ред.) и Л.Е. Зиганшиной (отв. ред.). – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 800 с.
14. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7 – С. 29–36.

15. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике. - Санкт-Петербург, ЭЛБИ-СПб., 2003. – 128 с.
16. Chojnacka K., Michalak I., Zielinska A. et al. Interrelationship between elements in human hair: the effect of gender // *Ecotoxicol. Environ Saf.* – 2010. – V. 73, № 8. – P. 2022–2028.
17. Gutowska I., Baranowska-Bosiacka I., Rybicka M. et al. Changes in the concentration of microelements in the teeth of rats in the final stage of type I diabetes, with an absolute lack of insulin // *Biol Trace Elem Res.* – 2011. – V. 139, № 3. – P. 332–340.
18. Gyorfı J., Geosel A., Vetter J. Mineral composition of different strains of edible medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* peck // *J. Med. Food.* – 2010. – V. 13, № 6. – P. 1510–1514.
19. Hannan M.A., Faraji B., Tanguma J. et al. Maternal milk concentration of zinc, iron, selenium, and iodine and its relationship to dietary intakes // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2009. – V. 127, № 1. – P. 6–15.
20. Schonfeld P., Wojtczak L. Brown adipose tissue mitochondria oxidizing fatty acids generate high levels of reactive oxygen species irrespective of the uncoupling protein-1 activity state // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – V. 1817(3). – P. 410–418.
21. Singh A.K., Mishra P., Singh N. Study of nonenzymatic antioxidant and lipid peroxide levels in rheumatoid arthritis // *Universal Journal of medicine and dentistry.* – 2012. – V. 1(2). – P. 010–013.

Резюме

В экспериментах на белых лабораторных крысах показано, что после внутрибрюшинного однократного введения циклофосамида в дозе 40 мг/кг в исследованных органах - головном мозге, печени и почках содержание макроэлементов: кальция, фосфора, калия, натрия и магния; условно жизненно необходимых элементов: бора, кремний, никель, ванадий, мышьяк, литий и девяти токсичных элементов: олово, серебро, стронций, алюминий, свинец, ртуть, бериллий, сурьма, лантан не изменяется по сравнению с контрольной группой крыс. Исключение составляют мышьяк (условно жизненно необходимый элемент) содержание которого достоверно уменьшается в почках и кадмий (токсичный микроэлемент) содержание которого достоверно уменьшается во всех исследованных органах. Циклофосамид дозах 20, 40, 60 и 80 мг/кг не влияет на перекисное окисление липидов в сердце, печени, почках, надпочечниках и селезенке крыс. Исключение составляют тимус, в котором циклофосамид достоверно увеличил содержание диеновых конъюгатов при концентрациях 60 и 80 мг/кг и головной мозг, в котором циклофосамид в дозе 80 мг/кг достоверно увеличил уровень малонового диальдегида. Таким образом, циклофосамид оказывает слабое влияние на баланс макроэлементов, условно жизненно необходимых и токсичных микроэлементов (ЦФ), а также на уровень индикаторов ПОЛ в большинстве органов через 24 часа после однократного внутрибрюшинного введения экспериментальным животным.

Ключевые слова

Abstract

As a result of experiments with white laboratory rats, it was shown that the level in brain, liver and kidneys of macronutrients (calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium), of six conditionally essential microelements (boron, silicon, nickel, vanadium, arsenic, lithium) and of nine toxic microelements (tin, silver, strontium, aluminum, lead, mercury, beryllium, antimony, lanthanum) was not influenced after intraperitoneal single administration of cyclophosphamide (CP) in a dose of 40 mg/kg in comparison with rat control group. However, levels of arsenic in kidneys and cadmium in all organs were decreased which made exceptions. Furthermore, in general, it was found that cyclophosphamide single i.p. administration (in doses of 20, 40, 60 and 80 mg/kg) didn't influence lipid peroxidation indicators – diene conjugates, DC and malonic dialdehyde, MDA – in rat heart, liver, kidneys, adrenal glands and spleen. Nevertheless, as exceptions, CP administration (60 or 80 mg/kg) increases statistically reliable the DC content in thymus, and MDA level was statistically reliable increased after CP administration in a dose of 80 mg/kg. Thus, in the majority of cases, CP made a weak impact on a balance of macro- and microelements (essential and toxic), and on LPO indicators' level in majority of rat organs studied in 24 hours after single i.p. administration.

Key words: macronutrients, microelements, lipid peroxidation, LPO indicators, diene conjugates, malonic dialdehyde, cyclophosphamide.

Контакты:

Ибрагимова Миляуша Якубовна. E-mail: Milyaushayakub@rambler.ru