

Влияние моликсана на активность окислительно-восстановительных процессов в слизистой оболочке полости рта экспериментальных животных при комбинированном химиолучевом воздействии

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Показано, что комбинированное воздействие цисплатина и краниокаудального гамма-облучения вызывает значительное повышение интенсивности перекисидации липидов в слизистой оболочке полости рта экспериментальных животных. Через 3 суток после введения цисплатина и облучения концентрация диеновых конъюгатов и малонового диальдегида возросла в 1,46 и 1,57 раз, соответственно. В период разгара орального мукозита (15 сут после комбинированного химиолучевого воздействия) содержание этих продуктов перекисного окисления липидов увеличилось по сравнению с группой интактных животных в 1,6 раза. При этом активность супероксиддисмутазы оставалась на уровне необлученного контроля, а каталазы и глутатион-пероксидазы даже понизилась на 25–30%. Курсовое введение моликсана в дозе 30 мг/кг через день в течение 15 сут после комбинированного химиолучевого воздействия сопровождалось уменьшением концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в 1,5 раза и повышением активности антиоксидантных ферментов. Нормализация процессов перекисного окисления липидов под влиянием моликсана сопровождалась снижением тяжести орального мукозита.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, моликсан, цисплатин, гамма-облучение, оральные мукозиты, ферменты антиоксидантной защиты.

Введение. Согласно существующим в настоящее время представлениям, любой патологический процесс протекает на фоне образования активных форм кислорода и интенсификации свободно-радикального окисления биосубстратов [10]. В ответ на это происходит активация антиоксидантной системы организма. Ее представляют низкомолекулярные соединения – ловушки радикалов, а также антиперекисные ферменты: супероксиддисмутазы, глутатион-пероксидазы, каталазы и пр. [13].

Процессы, ведущие к развитию осложнений химио-, лучевой- и химиолучевой терапии, в частности к формированию оральное мукозита, полиэтиологичны и часто имеют схожие патогенетические механизмы [20, 25]. Одним из значимых патогенетических звеньев является нарушение гомеостаза в процессах перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в слизистой оболочке полости рта [8, 11, 23]. Универсальный характер процессов перекисидации липидов обуславливает их повсеместное распространение во всех активно метаболизирующих системах. Двойственная роль промежуточных продуктов перекисного окисления липидов, их способность выступать в качестве катализаторов аутоокисления создают реальную опасность разворачивания свободно-радикальных цепных реакций и, как следствие, полной деструкции мембранных структур, клеток и организмов при

доступе кислорода [9, 15]. Лишь наличие факторов противоположного действия, в частности антиоксидантной системы, удерживает процесс перекисидации липидов на стационарном базальном уровне, не препятствующем нормальной жизнедеятельности [10, 24]. Складывающееся тем самым прооксидантно-антиоксидантное равновесие является важнейшим механизмом гомеостаза. В условиях сильного оксидативного стресса, развивающегося, например, при облучении или действии высокотоксичных химических веществ, возможностей эндогенных систем антиоксидантной защиты для поддержания физиологического равновесия в окислительно-восстановительных процессах часто оказывается недостаточно, вследствие чего возникает необходимость применения антиоксидантов [5, 12, 14].

Цель исследования. Экспериментально оценить влияние комбинированного химиолучевого воздействия на интенсивность окислительно-восстановительных процессов в слизистой оболочке полости рта лабораторных животных, а также исследовать возможность коррекции выявленных нарушений с помощью моликсана.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на 60 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из

питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово» (Ленинградская обл.) и выдержанных в течение 14 сут до начала эксперимента в карантине. Животных содержали в стандартных условиях вивария, кормление осуществляли *ad libitum* в первой половине дня. Исследования проводили согласно требованиям нормативно-правовых документов о порядке проведения экспериментальных работ с применением лабораторных животных.

Химиолучевой оральный мукозит моделировали введением животным цитостатика цисплатина с последующим (через 24 ч) краниокаудальным гамма-облучением крыс в дозе 10 Гр [21]. Цисплатин фирмы «Teva» (Израиль) вводили однократно подкожно в дозе 7,0 мг/кг (максимально переносимая доза для данного вида животных). Облучение осуществляли с помощью исследовательской установки «ИГУР-1» с источником гамма-квантов ¹³⁷Cs при мощности дозы 21,07×Гр/мин.

Лечение экспериментального орального мукозита проводили с помощью моликсана – фармакопейного иммуномодулятора с выраженной антиоксидантной активностью. Моликсан – препарат закрытого акционерного общества «Фарма вам» (Россия) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг сразу после облучения и далее через день на протяжении 15 сут (на 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15 сут наблюдения).

Животные были разделены на 3 группы по 20 крыс в каждой: 1 группа – интактные животные; 2 группа – животные, подвергнутые комбинированному химиолучевому воздействию: за 24 ч до облучения введение цисплатина в дозе 7,0 мг/кг + облучение в дозе 10 Гр; 3 группа – животные, подвергнутые комбинированному химиолучевому воздействию и последующему лечению моликсаном: за 24 ч до облучения введение цисплатина в дозе 7,0 мг/кг + облучение в дозе 10 Гр + лечение моликсаном по схеме.

В ходе эксперимента животных наблюдали в течение 30 сут, ежедневно оценивая общее состояние

(двигательную активность, пищевую возбудимость, изменение массы тела) и клиническую картину мукозита (стоматита) слизистой оболочки полости рта.

Отбор материала для биохимических исследований проводили до химиолучевого воздействия, на 3 и на 15 сут после облучения. Для этого животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом методом декапитации, извлекали слизистую оболочку полости рта (в районе языка и щек) с подслизистым мышечным слоем и замораживали в жидком азоте. В гомогенатах слизистой оболочки и подлежащих мягких тканей полости рта определяли продукты перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид [19] и диеновые конъюгаты [2, 15], а также изучали активность ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы [7], каталазы [6] и глутатионпероксидазы [3].

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. Рассчитывали среднее значение и ошибку среднего ($M \pm m$). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлен выраженный цитотоксический эффект комбинированного химиолучевого воздействия, проявлявшийся в активации процессов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке полости рта животных (табл.).

Так, уже на 3 сут после химиолучевого воздействия выявлено повышение содержания продуктов окислительной дегградации липидов – диеновых конъюгатов (в 1,46 раза) и малонового диальдегида (в 1,57 раза) по сравнению с исходным уровнем, зарегистрированным у интактных животных (табл.). Эти сдвиги, по-видимому, были обусловлены нарушениями в системе антиоксидантной защиты: в этот же период

Таблица

Влияние моликсана на состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в слизистой оболочке полости рта белых беспородных крыс при комбинированном химиолучевом воздействии

Показатель	Диеновые конъюгаты, нмоль/г ткани	Малоновый диальдегид, нмоль/г ткани	Супероксид-дисмутаза, ммоль/мин·мг белка	Каталаза, ммоль/мин·г белка	Глутатионпероксидаза, нмоль/мин·г белка
Интактные животные	15,13±1,51	42,07±5,38	49,28±3,27	27,32±1,62	5,8±0,6
3-и сут после химиолучевого воздействия					
Физиологический раствор	22,08±1,91*	65,67±5,45*	47,45±2,97	21,84±1,23*	4,7±0,5
Моликсан	15,02±1,72#	48,58±3,85#	63,71±5,31*#	37,15±4,45*#	8,2±1,2#
15-е сут после химиолучевого воздействия					
Физиологический раствор	24,96±2,81*	73,20±6,35*	49,56±2,82	18,59±1,63*	7,9±0,5*
Моликсан	16,59±1,62#	50,73±4,89#	77,36±4,97*#	31,54±2,81#	14,5±1,1*#

Примечание: * – различия с группой «интактные животные»; # – с группой «физиологический раствор», $p \leq 0,05$.

наблюдалось умеренное (на 25–30%) угнетение активности каталазы, тенденция к снижению активности глутатион-пероксидазы, а активность супероксиддисмутазы практически не изменялась.

На 15 сут на фоне развившегося химиолучевого воздействия содержание продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида по сравнению с уровнем до химиолучевого воздействия повысилось еще больше (на 65–70%). Активность супероксиддисмутазы практически не изменилась, активность каталазы была снижена на 40%, а активность глутатион-пероксидазы, напротив, была выше уровня интактных животных более чем на 30%.

Курсовое введение моликсана сопровождалось уменьшением содержания в крови диеновых конъюгатов и малонового диальдегида к 3-м и 15-м сут в 1,5 раза по сравнению с нелечеными животными. В результате концентрация этих продуктов перекисной дегградации липидов в периферической крови крыс, подвергнутых комбинированному химиолучевому воздействию и лечению моликсаном, практически не отличалась от показателей интактных животных. Кроме того, введение моликсана способствовало активации ферментов антиоксидантной защиты. Так, активность супероксиддисмутазы у получавших моликсан крыс на 3-и сут наблюдения была выше на 20%, а на 15-е сут – на 30% по сравнению с животными, подвергнутыми химиолучевому воздействию без лечения. Активность каталазы под влиянием моликсана к 3-м сут наблюдения увеличивалась на 55%, а к 15-м сут – на 45% и практически не отличалась от значения этого показателя у интактных крыс. Моликсан также способствовал существенной активации глутатион-пероксидазы: ее активность динамично нарастала и к 15-м сут практически в 2 раза превышала показатели животных, подвергнутых химиолучевому воздействию без лечения, и почти в 2,8 раза – интактных животных.

Полученные данные могут служить подтверждением опосредованной антиоксидантной активности моликсана. Существенно снижая выраженность и продолжительность активации процессов перекисного окисления липидов при действии химиолучевых факторов, моликсан может оказать стабилизирующее действие на состояние клеточных мембран и тем самым повысить эффективность отдельных мембранных функций этих клеток, в том числе предотвращая их гибель.

Показали, что моликсан, вводимый с лечебной целью после химиолучевого воздействия, способствует росту активности каталазы, глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутазы в тканях полости рта крыс. Повышение активности антиоксидантных ферментов способствует ингибированию избыточной перекисидации липидов, что проявляется в снижении концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в слизистой оболочке полости рта. Кроме того, повышая активность ферментов антиоксидантной защиты, моликсан препятствует реализации более глубокого повреждения тканей реакционно-способными про-

дуктами радиолиза воды и активными формами кислорода.

В литературе накоплены многочисленные данные, касающиеся механизмов перекисного окисления липидов и его роли в нормальном и патологическом функционировании клеток [1, 10, 14]. Показано, что кроме главного субстрата перекисления – молекул биомембран и ядерного хроматина – активные формы кислорода вызывают и окислительную модификацию белков [1, 4]. Тиолсодержащие белки участвуют практически во всех ключевых биохимических процессах. Они представлены в клетках в двух состояниях: восстановленном (-SH-) и окисленном (-S-S-), причем концентрация SH-групп в несколько раз выше концентрации S-S-групп. По мнению R.L. Levine [18], -S-S-связи являются составной частью антиоксидантной защиты. Разнообразные окислители активно реагируют S-S-группами, образуя оксиды серы. Поверхностно экспонированные, они создают очень высокую концентрацию реагента, обеспечивая тем самым надежную защиту от окислительного разрушения всей молекулы. Тем самым создается эффект амплификации антиоксидантного переноса каждого остатка аминокислоты, содержащей S-S-группу [16, 22]. Это состояние можно охарактеризовать соотношением концентрации SH- и S-S-групп (SH/S-S), получившим наименование тиолдисульфидного соотношения. Изменение редокс-системы в сторону восстановления сменяется противоположной фазой – сдвигом в сторону окисления, что можно рассматривать как признак ее активации и истощения, свидетельствующий об окислительном повреждении белковой молекулы [13, 17]. В этом плане окисленный глутатион, входящий в структуру моликсана, по отношению к изучаемым антиоксидантным ферментам, функционально активная конформация которых требует дисульфидной сшивки в структуре молекулы, может выступать как парциальный агонист, восстанавливающий их активность [24].

Заключение. Установлено, что применение моликсана способствует активации ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатион-пероксидазы) с последующим ингибированием процессов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке полости рта животных, подвергнутых комбинированному химиолучевому воздействию. Кроме того, фармакологическое действие моликсана может быть направлено на восстановление функциональной активности поверхностно-клеточных рецепторов различных семейств, внеклеточных регуляторных и транспортных молекул пептидной природы, содержащих сульфгидрильные группы.

Литература

1. Барабой, В.А. Перекисное окисление липидов и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин. – СПб.: Наука, 1992. – 148 с.
2. Гаврилов, В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных

- экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1998. – № 2. – С. 60–64.
3. Гаврилова, А.Р. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстратов / А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 721–724.
 4. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 413–421.
 5. Игуменцева, В.В. Установление эффективности природного антиоксиданта для профилактики интоксикации дициклопентадициклина (ДЦПД) / В.В. Игуменцева // Вест. Росс. воен.-мед. акад. – 2008. – № 1. – Прилож., ч. 1. – С. 68–71.
 6. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–58.
 7. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кварцита / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, вып. 2. – С. 88–91.
 8. Масленникова, А.В. Термолучевая и химиолучевая терапия местно-распространенного рака глотки и гортани: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А.В. Масленникова. – Н. Новгород, 2008. – 47 с.
 9. Пастушенков, В.Л. Влияние инициации процессов перекисного окисления липидов на клинико-лабораторные показатели внутриклеточного метаболизма глюкозы у больных сахарным диабетом / В.Л. Пастушенков, А.Н. Дрыгин, С.Б. Шустов // Вест. Росс. воен.-мед. акад. – 2010. – № 1. – С. 68–71.
 10. Плужников, Н.Н. Оксидативный стресс. Фундаментальные и прикладные проблемы / Н.Н. Плужников [и др.] // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины: Науч. тр. НИИЦ (МБЗ) ГНИИИ ВМ МО РФ. – СПб., 2000. – Т. 2. – С. 193–223.
 11. Полевая, Л.П. Клинико-экспериментальное обоснование применения антиоксидантного комплекса в терапии лучевого стоматита: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.П. Полевая. – СПб., 2008. – 20 с.
 12. Прохвятилов, Г.И. Обоснование применения антиоксидантного комплекса в терапии лучевого стоматита онкологических больных челюстно-лицевой области / Г.И. Прохвятилов, И.Ш. Галеев, Л.П. Полевая // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2007. – № 17. – Прилож., ч. 2. – С. 440.
 13. Соколовский, В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1998. – Т. 6, № 34. – С. 2–11.
 14. Сосюкин, А.Е. К патогенезу отдаленных нейропатий, индуцированных хлорофосом / А.Е. Сосюкин, В.Б. Василюк, М.А. Юдин // Вест. Рос. воен.-мед. акад. – 2005. – № 1. – С. 259–260.
 15. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С. 63–64.
 16. Cumming, R.S. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress / R.S. Cumming // J. biol. chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 21749–21758.
 17. Jordan, P.A. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function / P.A. Jordan, J.M. Gibbins // Antioxid. redox signal. – 2006. – Vol. 8, № 3/4. – P. 312–324.
 18. Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, going diseases / R.L. Levine // Free radic. biol. med. – 2002. – Vol. 32, № 9. – P. 790–796.
 19. Michara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Michara, M. Uchiyama // Anal. biochem. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 271–278.
 20. Plemons, J.M. Oral health care in cancer patients: you can make a difference! / J.M. Plemons, K.V. Rankin, E. Benton // Tex. dent. j. – 2013. – Vol. 130, № 8. – P. 682–690.
 21. Rezvani, M. Modification of radiation-induced acute oral mucositis in the rat / M. Rezvani, G.A. Ross // Int. j. radiat. biol. – 2004. – Vol. 80, № 2. – P. 177–182.
 22. Salo, P.S. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation / P.S. Salo [et al.] // Biochem. j. – 1990. – Vol. 265, № 20. – P. 11919–11927.
 23. Sonis, S.T. Oral mucositis in cancer therapy / S.T. Sonis // J. support oncology. – 2004. – Vol. 2. – P. 3–8.
 24. Tew, K.D. Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation / K.D. Tew // Biochem. pharmacol. – 2006. – Vol. 6. – P. 1–13.
 25. Trotti, A. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review / A. Trotti [et al.] // Radiother. Oncol. – 2003. – Vol. 66, № 3. – P. 253–262.

A.E. Antushevich, A.A. Yartseva, A.N. Grebenyuk, V.G. Antonov

Effect of molixan on activity of redox processes in the oral mucosa of experimental animals with combined chemoradiation action

Abstract. It has been shown that the combined action on animals of cytostatic cisplatin and cranio-caudal gamma irradiation causes a significant increase in lipid peroxidation processes in the oral mucosa. At the height of chemoradiation oral mucositis (3 days after administration of cisplatin and gamma irradiation) the content of lipid peroxidation products – diene conjugates and malondialdehyde increased compared with a group of intact animals by 1,46 and 1,57 times respectively. The activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase remained at the level of non-irradiated controls, and superoxide dismutase – even dropped by 25–30%. Molixan course administration at a dose of 30 mg/kg every other day for 15 days after exposure to the combined chemoradiotherapy was accompanied by a decrease of meanly 1,5 times concentrations of lipid peroxidation products and increase of the activity of antioxidant enzymes. Normalization of lipid peroxidation processes after molixan was accompanied by reduction of the severity of oral mucositis.

Key words: lipid peroxidation, molixan, cisplatin, gamma-irradiation, oral mucositis, antioxidant defense enzymes.

Контактный телефон: 8-921-965-60-08; e-mail: antu-anna@yandex.ru