

ЗМІНИ СТАНУ НИРОК ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЦИТОСТАТИКІВ

С. О. БАБІЙ¹, Т. О. ЛОСКУТОВА², Н. І. ШТЕМЕНКО¹

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: babiy_s@meta.ua;

²Дніпропетровська державна медична академія, Україна

Встановлено, що розвиток карциноми Герена Т8 та введення цисплатину зумовлює пошкодження нирок щурів. Це призводить до збільшення відносної ваги нирок, протеїнурії, зміни активності γ -глутамілтрансферази та лактатдегідрогенази у гомогенаті нирок та сечі, зниження відносної реабсорбції та клубочкової фільтрації. Введення наноліпосомних форм кластерних сполук ренію нормалізує вищезазначені показники та знижує токсичну дію цисплатину на нирки, що підтверджується біохімічними та морфологічними дослідженнями.

Ключові слова: нирки, кластерні сполуки ренію, цисплатин, протипухлинні препарати, нефротоксичність.

Раніше нами було показано, що кластерні сполуки ренію (III) з органічними лігандами одночасно виявляють антиоксидантні та протипухлинні властивості [1, 2]. Застосування цих сполук в умовах токсичного гепатиту сприяє нормалізації процесів клубочкової фільтрації та каналцевої реабсорбції в нирках експериментальних тварин [3]. Така дія комплексів ренію, на нашу думку, обумовлена гальмуванням вільнорадикальних реакцій *in vivo*, що пов'язано з наявністю почверного зв'язку в їхній структурі [4]. У наших попередніх роботах було розроблено протипухлинну систему реній-платина (Re-Pt), використання якої у моделі пухлинного росту практично повністю гальмувало ріст злоякісного новоутворення. Протокол запропонованої системи полягав у введенні цисплатину (одноразово) та кластерної сполуки ренію (десятикратно) за схемою антиоксидантної терапії [1, 2, 5]. Окрім ефективності протипухлинної системи, також було доведено здатність унікального почверного зв'язку (який відсутній у біологічних молекулах) знижувати побічні ефекти цисплатину — його токсичність.

Згідно зі своїми функціями, нирки є одним із найчутливіших органів ссавців щодо впливу екзогенних речовин [6, 7]. Так, в експериментах на тваринах було показано, що введення високих доз двовалентних перехідних металів (кадмію, цинку, свинцю) призводить до оксидативного стресу, що супроводжується пошкодженням різних біологічних макро-

молекул, мембранних структур та зміною макроергічних сполук у клітинах нирок [8].

Метою цієї роботи було з'ясування можливих нефропротекторних властивостей сполук ренію із почверним зв'язком на моделі пухлинного росту у разі застосування цисплатину та протипухлинної системи Re-Pt.

Матеріали і методи

У роботі була використана кластерна сполука ренію (III) — цис-дихлортетра- μ -півалатодиренійум (III) $\text{Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_4\text{Cl}_2$ (Re), яка була синтезована на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету [9]. Наноліпосоми навантажені системою Re-Pt (ліпідною складовою був фосфатидилхолін), також виготовлялись в Українському державному хіміко-технологічному університеті [10].

Експерименти проводили на щурах лінії Wistar із масою тіла 100–150 г, яким перещеплювали підшкірно у ліву задню лапу карциному Герена Т8 (0,5 мл 20%-ї суспензії клітин у фізіологічному розчині) [11]. Штам клітин одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Щурів було поділено на групи по 10 тварин у кожній: інтактні тварини; щури-пухлиноносії (група — Т8 — контроль); щури-пухлиноносії, яким вводили цисплатин (сPt) (група — Т8 + сPt); щури-пухлиноносії, яким вводили сполуку ренію у наноліпосомах (група — Т8 + [Re]nl); щури-пухлиноносії, яким вводили сполуку ренію у наноліпосомах

і сPt (група – T8 + [Re]nl + сPt); шурипухлиноносії, яким вводили наноліпосомну систему Re-Pt у співвідношенні компонентів 4 : 1 та 4 : 2 (групи – T8 + [Re+сPt(4 : 1)]nl та T8+[Re+сPt(4 : 2)]nl). Розчин цисплатину вводили внутрішньочеревинно одноразово у дозі 8 мг/кг на 9-у добу після трансплантації пухлини [12]. Кластерні сполуки ренію у формі ліпосом (розміром 50–100 нм) вводили внутрішньочеревинно на 3-у добу після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу (протягом 21 доби) за схемою антиоксидантної терапії в дозі 7 мкмоль/кг із кінцевим молярним співвідношенням сполук Re і Pt 4 : 1. Змішані наноліпосомні форми розміром 10–100 нм, навантажені сполуками Re та сPt у молярному співвідношенні 4 : 1 та 4 : 2, вводили десятикратно внутрішньочеревинно, за схемою антиоксидантної терапії, починаючи із 3-ї доби після трансплантації пухлини з розрахунку 7 мкмоль/кг ренієвої сполуки [13].

Перед декапітацією у тварин проводили збір сечі в умовах індукованого діурезу з використанням 1%-го водного навантаження за допомогою сталевого зонду з оливою [14]. Свіжозібрану сечу центрифугували і впродовж наступних 4 год проводили аналіз зразків.

Декапітацію тварин здійснювали під ефірним наркозом відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, використаних в експериментальних та інших наукових цілях». Після цього у тварин видаляли обидві нирки і збирали кров у пробірки з гепарином. Нирки промивали від залишків крові охолодженим фізіологічним розчином і зважували. У 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) готували 10%-і гомогенати нирок [15]. Концентрацію креатиніну, загально-го протеїну та активність лактатдегідрогенази (ЛДГ, 1.1.1.27) і γ -глутамілтрансферази (ГГТФ, 2.3.2.2) визначали в сечі та гомогенаті нирок із використанням стандартних наборів реактивів (Філісіт-діагностика, Україна). Концентрацію креатиніну виражали в ммоль/л проби, концентрацію протеїну в сечі – у мг/мл проби, що утворилась за 1 хв, концентрацію протеїну в гомогенаті нирок – у г/г сухої ваги тканини. Активність ЛДГ виражали відповідно у ммоль або мкмоль пірувату/год·мг протеїну у пробі і ГГТФ – у ммоль або мкмоль *n*-нітроаніліду/год·мг протеїну. Кліренс креатиніну (C_{Cr}) і відносну реабсорбцію води оцінювали за допомогою методик, що були описані в попередній роботі [3].

Гістологічні дослідження нирок проводили з використанням світлового мікроскопа

Biolar (Польща) після фарбування зрізів тканин гематоксиліном та еозинном загальновідомими методами.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням програми *SPSS v13* та стандартного пакету комп'ютерних програм MS Excel. Вірогідність відмінностей між групами даних розраховували за допомогою обчислення непараметричного *U*-критерію Манна-Уїтні. Оцінку взаємозв'язків між біохімічними показниками проводили за допомогою кореляційного аналізу за критерієм Спірмана (r_s). Результати при $P < 0,05$ вважали достовірними [16].

Результати та обговорення

За результатами дослідження було встановлено, що розвиток пухлини не зумовлює вірогідні зміни ваги нирок відносно маси тіла щурів.

Поряд з цим, введення протипухлинної сполуки сPt збільшувало цей показник у 1,5 раза в порівнянні із групою інтактних тварин (рис. 1). Такі зміни узгоджуються з результатами досліджень, які вказують на збільшення (в 1,3 раза) відносної маси нирок на 10-й день після одноразового введення сPt щурам [17, 18]. Це явище детально описано в сучасній нефрології і має назву компенсаторної гіпертрофії нирок [19]. Вважають, що збільшення маси нирок пов'язане із адаптивним збільшенням розмірів нефрону, яке відбувається у відповідь на часткову втрату функціонуючих нефронів. Цей процес активується за дії токсичних речовин і ліків, метаболічних розладів організму, а також внаслідок різних захворювань (цукровий діабет, пухлини, хвороби нирок) [20].

У разі введення наноліпосом [Re]nl, [Re]nl із розчином сPt і системи [Re+сPt (4 : 1)]nl маса нирок у щурів вірогідно не змінюється. Збільшення концентрації сPt у складі протипухлинної системи ([Re+сPt (4 : 2)]nl) зумовлює збільшення маси нирок у 1,25 раза.

Існує думка, що головним механізмом ниркової гіпертрофії є прискорення синтезу протеїнів (структурні компоненти, сполучна тканина, ензими, стресові протеїни) та/або зниження швидкості їхньої деградації [20, 21]. Основна адаптивна відповідь клітин на ушкодження розвивається вже на 3-й день після введення різних нефротоксичних речовин, таких як протипухлинні препарати, антибіотики, солі важких металів та інші [19]. Ця теорія підтверджується нашими даними щодо різної концентрації протеїнів у гомогенатах нирок

Таблиця 1. Відносна маса нирок щурів, вміст протеїну в сечі та гомогенаті нирок

Групи	Відносна маса нирок, %	Вміст протеїну в сечі, мг/мл·хв	Вміст протеїну в гомогенаті нирок, г/г тканини
Інтактні тварини	0,40 ± 0,05	14,41 ± 0,17	0,436 ± 0,013
T8 – контроль	0,48 ± 0,03	23,13 ± 0,95*	0,694 ± 0,032*
T8+cPt	0,60 ± 0,04*	16,25 ± 0,62*#	0,623 ± 0,010*
T8+[Re]nl	0,41 ± 0,01	13,80 ± 0,93#	0,565 ± 0,064
T8+[Re]nl+cPt	0,46 ± 0,02	17,01 ± 0,82*	0,432 ± 0,044#
T8+[Re+cPt(4 : 1)]nl	0,42 ± 0,03	14,32 ± 1,20#	0,537 ± 0,058
T8+[Re+cPt(4 : 2)]nl	0,50 ± 0,05*	16,32 ± 1,74#	0,670 ± 0,079*

* $P < 0,05$ відносно інтактної групи; # $P < 0,05$ відносно групи тварин з T8

(табл. 1), які відбувалися відповідно до змін маси нирок.

Так, у контрольній групі щурів із карциномною Герена T8 та у групі тварин, яким вводили cPt (T8+cPt) вміст протеїнів у гомогенаті ниркової тканини збільшувався у 1,5 раза порівняно з інтактними тваринами. За одночасного введення [Re]nl з cPt (T8+[Re]nl+cPt) вміст протеїнів у гомогенаті нирок знижується до нормального рівня.

У групах, яким вводили сполуку Re, вірогідне зниження вмісту протеїнів у нирковому гомогенаті (в 1,61 раза відносно контрольної групи) було лише у групі T8+[Re]nl+cPt.

Отже, зміни вмісту протеїнів у нирках відбуваються пропорційно змінам їхньої маси. Між цими двома показниками відмічається значний позитивний кореляційний зв'язок ($r = +0,865$; $P < 0,05$). Таким чином, збільшення вмісту протеїнів у нирковій тканині та гіпертрофія є раннім проявом та передвісником більш суттєвих змін у нирках під час росту пухлини та застосуванні проти-пухлинних сполук [21].

Активация компенсаторних механізмів у разі токсичного ушкодження нирок проявляється у прискоренні швидкості потоку плазми в гломерулах і підвищенні гломерулярного гідравлічного тиску [20, 22]. Це має довготривалі шкідливі наслідки для нефронів, що зберегли свою цілісність, оскільки в кожному окремому нефроні зростає швидкість фільтрації, а також реабсорбції води і розчинених речовин [23]. Як наслідок, змінюється проникність плазматичних мембран, швидкість біохімічних процесів і хімічний склад внутрішньоклітинного і позаклітинного середовища [19]. Однією з найдостовірніших ознак ураження паренхіми нирок є екскреція

протеїнів із сечею (протеїнурія). За вираженістю протеїнурії оцінюють ступінь ураження нирок [19, 24].

У групах тварин-пухлиноносіїв відмічались зміни концентрації загального протеїну в сечі (табл. 1). Як видно, значне збільшення екскреції протеїнів (у 1,6 раза) спостерігається лише в контрольній групі тварин із карциномною Герена T8.

За даними літератури введення cPt шурам у терапевтичній дозі спричинює збільшення концентрації протеїнів у сечі у 2 раза [24], але нами не виявлено змін цього показника. Нефротоксична дія cPt, перш за все, пов'язана зі специфічним накопиченням сполук Pt в нирках. Є дані щодо наявності кореляції між акумуляцією Pt в корі нирок і кількістю ушкоджених клітин [25]. Цей протипухлинний засіб переважно накопичується в нирках у перші 24 год і його концентрація зберігається впродовж наступних 72 год, після чого відбувається повне виведення препарату з організму [25]. Отже, можна припустити, що внаслідок виведення cPt із нирок відбувається регенерація ниркової тканини і поновлення її функціонування та біохімічних процесів. Але, механізм протеїнурії складний і залежить від багатьох причин. На ранніх стадіях розвитку більшості нефропатій до сечі потрапляють переважно низькомолекулярні плазматичні протеїни. Це обумовлено порушенням процесів фільтрації та ушкодженням гломерул (гломерулярна протеїнурія) або може бути пов'язане з ушкодженням каналців і змінами у процесі реабсорбції (тубулярна протеїнурія) [9, 18]. Наявність у сечі протеїнів із високою молекулярною масою більш характерна для вираженого ураження нирок. [9]. Окрім цього, поява протеїнів у сечі можли-

ва внаслідок збільшення концентрації низькомолекулярних протеїнів у плазмі крові (легкі ланцюги імуноглобулінів, гемоглобіну і міоглобіну) [9, 18].

Цей показник найпершим реагує на будь-які зміни ниркового гомеостазу, але він може використовуватись лише як загальний маркер стану сечостатевої системи, оскільки не вказує ні на ступінь, ні на локалізацію ушкодження [26–28].

Нефротоксична дія лікарських засобів та хімічних сполук часто носить локальний характер [29, 30]. Більшість нефропатій, що супроводжуються протеїнурією асоційовані із прогресивним запаленням гломерул, що зрештою призводить до їх лізису [18].

Стандартним маркером ушкодження гломерулярного апарату є рівень креатиніну в плазмі крові [25, 31]. Ця сполука утворюється шляхом неензиматичної дегідратації м'язового креатину. Внаслідок цисплатинової інтоксикації у тварин і людей концентрація цієї речовини збільшується в 2–3 рази вже через 2 доби [25, 30, 31], а найбільшої концентрації досягає на 4–5 добу (після введення cPt у дозі 7,5 мг/кг). У цей період рівень креатиніну в плазмі крові збільшується в 5 разів порівняно з контрольною групою. У подальшому відбувається компенсаторне відновлення функції нирок і вже на 7-у добу цей показник знижується вдвічі [8].

Як показано (табл. 2), під час розвитку пухлини і за введення cPt збільшується рівень креатиніну у плазмі крові порівняно з інтактними тваринами в 1,2 і 1,5 рази відповідно.

Поряд із цим, у щурів із карциною рівень креатиніну в сечі збільшується у 1,5 раза, а у разі застосування cPt знижується у 3,0 раза порівняно з інтактною групою. Причиною цього, очевидно, є часткова втрата нирками функціональної здатності [31]. У разі використання Re у різних комбінаціях із cPt спостерігалась тенденція до зниження концентрації креатиніну у крові. У цих самих групах вміст креатиніну в сечі знижувався в середньому в 1,3 раза у порівнянні з контрольною групою, але не був нижчим за відповідний показник у інтактних тварин, що вказує на збереження функції нирок [31].

Для визначення швидкості гломерулярної фільтрації використовується кліренс ендогенного креатиніну, який враховує зміни концентрації цієї речовини у плазмі та сечі відповідно до об'єму утвореної сечі за певний проміжок часу [19, 25]. Вважається, що рівень

очищення крові від цієї сполуки наближається до рівня істинної фільтрації в гломерулах. Основною перевагою цього показника є те, що він не залежить від дієти, фізичного навантаження або ушкодження м'язової тканини [33]. Більшість авторів додержуються думки, що під час лікування онкологічних хворих цитостатиками знижується швидкість гломерулярної фільтрації [31]. Також за допомогою кліренсу креатиніну можна розрахувати рівень відносної реабсорбції води у каналцях. Цей показник є стабільним, незначні його зміни можуть вказувати на серйозні тубулярні ушкодження [34, 35].

Як видно (табл. 2), швидкість гломерулярної фільтрації в щурів у разі розвитку пухлини не змінюється порівняно із тваринами без пухлини. За введення cPt цей показник зменшується у 1,35 раза порівняно з тваринами інтактною групи, тоді як реабсорбція води знижується на 2,0% у групі з карциною і на 4,0% за введення cPt, що забезпечує стабільний рівень сечоутворення і виведення продуктів метаболізму (в тому числі і креатиніну).

Такі зміни вказують на токсичне ураження органу за використання протипухлинного препарату [18, 31, 33, 34]. А саме, гіпертрофія нирок, рання протеїнурія і зниження швидкості гломерулярної фільтрації – це прояви розвитку гострої ниркової недостатності, яка є результатом запальних процесів, втрати функціональних структур нирок (склероз тканини) і збільшення кількості сполучної тканини (фіброз) [18].

Нами раніше було показано, що [Re]nI проявляв слабкі антиканцерогенні і протипухлинні властивості, індекс гальмування росту пухлин становив близько 20–30% [1, 2]. Разом із тим, на фоні пухлинного росту спостерігалась стабілізація як біохімічних, так і фізіологічних показників нирок. Застосування наноліпосом, навантажених комплексною сполукою ренію, підтримувало нормальний рівень функціонування нирок як за розвитку пухлини, так і у разі використання хіміотерапевтичного агента cPt. Наявність Re у складі змішаних наноліпосом зі співвідношенням компонентів 4 : 1 і 4 : 2, покращувало діяльність гломерулярного і каналцевого апарату нирок щурів із карциною Герена T8. У цих групах тварин показники відносної реабсорбції води, а в групі T8+[Re+cPt(4 : 1)]nI і показники кліренсу креатиніну, вірогідно не відрізнялись від значень інтактних тварин.

Негативний вплив новоутворення та cPt на гломерулярний апарат може мати подаль-

Таблиця 2. Показники функціонального стану нирок ($M \pm m$)

Групи	Концентрація креатиніну у плазмі, мкмоль/л	Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	Кліренс креатиніну, мкл/хв·100 г	Відносна реабсорбція води, %
Інтактні тварини	112,19 ± 4,80	9,55 ± 0,74	1066,0 ± 116,0	98,82 ± 0,68
T8 – контроль	137,98 ± 5,65*	14,44 ± 0,43*	931,31 ± 57,38	96,05 ± 0,28*
T8+cPt	164,25 ± 5,89* [#]	3,23 ± 0,74* [#]	788,20 ± 55,22* [#]	94,92 ± 0,08*
T8+[Re]nl	126,52 ± 2,06	12,87 ± 0,05* [#]	1196,30 ± 92,27	99,08 ± 0,39 [#]
T8+[Re]nl+cPt	126,52 ± 6,05	12,66 ± 0,76	1611,65 ± 146,67* [#]	98,99 ± 0,24 [#]
T8+[Re+cPt(4 : 1)]nl	125,53 ± 3,35	9,85 ± 1,08 [#]	1362,96 ± 89,45 [#]	98,65 ± 0,57 [#]
T8+[Re+cPt(4 : 2)]nl	127,57 ± 3,93	10,17 ± 1,09 [#]	1405,85 ± 94,88 [#]	98,74 ± 0,17 [#]

* $P < 0,05$ відносно інтактної групи; [#] $P < 0,05$ відносно групи тварин з T8

ший ушкоджуючий ефект на інші відділи нефрону [27, 28].

Одним із напрямів дослідження локального ушкодження нирок є визначення екскреції ензимів із сечею (ензимурія) [27, 28]. Пропонується велика кількість ензиматичних маркерів для контролю ураження нирок. Але найчастіше використовуються ГГТФ і ЛДГ, що у великих кількостях містяться в нирках і не фільтруються із крові [27]. Збільшення активності цих ензимів у сечі при нефропатіях виявляється вже в перші години, задовго до розвитку клінічно значимих змін в екскреції протеїнів із сечею, підвищення концентрації креатиніну у плазмі крові та інших ниркових маркерів [28].

Оскільки пряма взаємодія cPt із ЛДГ відсутня [35], то є можливим його використання як маркера нефротоксичної дії cPt

[19, 27]. Як видно (табл. 3), при розвитку пухлини та введенні cPt збільшується активність ЛДГ у гомогенаті нирок у середньому в 2 рази порівняно із групою інтактних тварин. У групах T8+[Re]nl і T8+[Re+cPt(4 : 1)]nl активність цього ензиму знижується порівняно з контрольною групою в 2,6 і 1,8 рази відповідно. В інших групах цей показник має значення близьке до контрольного.

До причин збільшення активності ЛДГ можна віднести наступні: гіперперфузії нирок і гіпоксії, що може спричинювати збільшення експресії відповідних генів і посилення синтезу ензиму в нефроні [36]; зміни ступеня зв'язування ЛДГ із іншими протеїнами [37]; зміни хімічного складу середовища в цитоплазмі та мітохондріях клітин (рН, співвідношення електролітів) [38].

Таблиця 3. Активність ЛДГ і ГГТФ у гомогенаті нирок та сечі ($M \pm m$)

Групи	ЛДГ		ГГТ П	
	Гомогенат нирок, ммоль пірувату/год·мг протеїну	Сеча, ммоль пірувату/год·мг протеїну	Гомогенат нирок, ммоль <i>n</i> -нітроаніліду/год·мг протеїну	Сеча, ммоль <i>n</i> -нітроаніліду/год·мг протеїну
Інтактні тварини	13,10 ± 2,53	15,05 ± 2,51	0,62 ± 0,14	0,11 ± 0,03
T8 – контроль	27,99 ± 2,17*	22,90 ± 0,91*	0,87 ± 0,09*	0,35 ± 0,01*
T8+cPt	29,71 ± 1,16*	38,59 ± 2,97* [#]	0,92 ± 0,12*	0,38 ± 0,07*
T8+[Re]nl	10,88 ± 0,57 [#]	12,88 ± 0,96 [#]	0,69 ± 0,01	0,050 ± 0,001* [#]
T8+[Re]nl+cPt	22,24 ± 0,17	13,99 ± 1,05 [#]	1,250 ± 0,009* [#]	0,060 ± 0,001* [#]
T8+[Re+cPt(4:1)]nl	15,88 ± 3,18 [#]	26,60 ± 2,22*	1,15 ± 0,16*	0,16 ± 0,02 [#]
T8+[Re+cPt(4:2)]nl	20,92 ± 1,20	40,10 ± 2,47* [#]	0,93 ± 0,01*	0,19 ± 0,03* [#]

* $P < 0,05$ відносно інтактної групи; [#] $P < 0,05$ відносно групи тварин з T8

Одночасно з цим, у групі тварин із пухлиною активність ЛДГ у сечі зростає в 1,5 раза, а при введенні cPt – у 2,6 раза (табл. 3). Це вказує на порушення цілісності клітин дистальних каналців нефронів у дослідних тварин [17]. Введення [Re]nl зменшує цитоліз нефроцитів як під час розвитку пухлини (група T8+[Re]nl), так і за введення cPt (група T8+[Re]nl+cPt), про що свідчить зниження активності ЛДГ у сечі до нормального рівня. Застосування протипухлинної системи [Re+cPt 4 : 1]nl було менш токсичним для нирок порівняно з використанням лише cPt і системи [Re+cPt 4 : 2]nl, оскільки активність ЛДГ в середньому в 1,5 раза нижча ($P < 0,05$) порівняно з цими дослідними групами (хоча і залишалась в 1,8 раза вищою відповідно до такого самого показника у групі інтактних тварин).

Токсична дія cPt пов'язана, в першу чергу, з ушкодженням епітеліальних клітин щіткової кайми проксимальних каналців нефрона [32]. Саме в цьому відділі нефрона відбувається біотрансформація cPt, що обумовлено високим вмістом глутатіону та експресією ГГТФ [39]. Цей ензим здійснює розщеплення кон'югатів глутатіону і платини з подальшим їх перетворенням на реактивні тіоли. З урахуванням специфічного накопичення cPt у проксимальних каналцях такі зміни спричинюють виснаження пулу сірковмісних антиоксидантів і ензимів (в першу чергу в цитозолі і мітохондріях) із подальшим посиленням процесів окислення [6, 40]. У разі значної інтоксикації це може призводити до ушкодження інших частин нефрона вже внаслідок непрямой дії ксенобіотика [40, 41].

Отже, раннім маркером стану цього відділу нефрона є ГГТФ [7, 24, 36, 39]. Активність ензиму визначається в сечі експериментальних тварин із різними нефропатіями навіть у разі відсутності гілоперфузії нирки, тому відображає незначні зміни у каналцевих клітинах [42].

Ріст пухлини та введення cPt зумовлювали збільшення активності ГГТФ у нирках (у 1,4–1,5 раза відповідно) порівняно з інтактними тваринами (табл. 3). У тварин, яким вводили тільки [Re]nl, активність ензиму залишалась на нормальному рівні. Введення [Re]nl із cPt і системи Re-Pt виявляє майже однаковий ефект на активність ГГТФ у гомогенаті тканини, а саме збільшується активність ензиму в 1,8 раза (порівняно з інтактною групою) і наближається до показників контрольної групи. У деяких дослідженнях показано, що після ін'єкції протипухлинних сполук на основі Pt

концентрація окисленого глутатіону в нирках збільшується [6, 41]. Порівняно з нашими результатами збільшення активності ГГТФ при пухлинному рості та застосуванні cPt може свідчити про активацію γ -глутамільного циклу та посилений розпад глутатіонових кон'югатів, що показано низкою авторів за розвитку нефропатій під час застосування препаратів на основі Pt [6, 39, 40].

Зміни активності ензиму в сечі були вираженішими (табл. 3). Так, пухлинний ріст та введення cPt мали майже однаковий ефект. У цих групах збільшується активність ГГТФ у 3,3 раза порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про лізис епітеліальних клітин проксимальних каналців і вихід цього лізосомального ензиму у міжклітинний простір [19, 26, 27, 29]. Застосування Re у наноліпосомній формі знижувало активність ГГТФ у сечі в 7 разів порівняно з контрольною групою тварин. Такий самий ефект цієї сполуки виявлено і за одночасного її застосування з cPt, при цьому активність ГГТФ нижча в 6,3 раза порівняно з групою тварин із пухлиною, яким вводили cPt. Таким чином, можна зробити припущення, що [Re]nl зменшує руйнування плазматичних мембран і вимивання ензиму із сечею.

Застосування протипухлинної системи у наноліпосомних формах також виявляє подібний ефект на активність ГГТФ у сечі, а саме активність ензиму знижується у 2,0 рази (порівняно з контрольною групою), що свідчить про значно менший лізис ниркових клітин.

Внаслідок порівняння активності досліджених ензимів у гомогенаті нирок і сечі щурів, яким вводили одночасно Re і cPt (групи [Re]nl + cPt, [Re+cPt (1 : 4)]nl, [Re+cPt (2 : 4)]nl), встановлено певну закономірність: зниження активності ГГТФ і ЛДГ у нирковій тканині супроводжується збільшенням їхньої активності в сечі. Для ГГТФ коефіцієнт кореляції становить $r = -0,770 \pm 0,034$ ($P < 0,05$), а для ЛДГ – $r = -0,61 \pm 0,051$ ($P < 0,05$). Таке явище зворотної залежності між активністю ензимів можна пояснити як вираженими змінами проникності мембран, так і посиленими порушеннями клітин каналцевого епітелію, що підтверджується результатами досліджень інших авторів [7, 44]. В інтактній групі та групах тварин, яким вводили сполуки Re, такий зв'язок не виявлено, що може вказувати на зменшення токсичного ушкодження ниркової тканини.

Введення cPt зумовлювало розвиток патологічних змін (рис. 1, II), які були

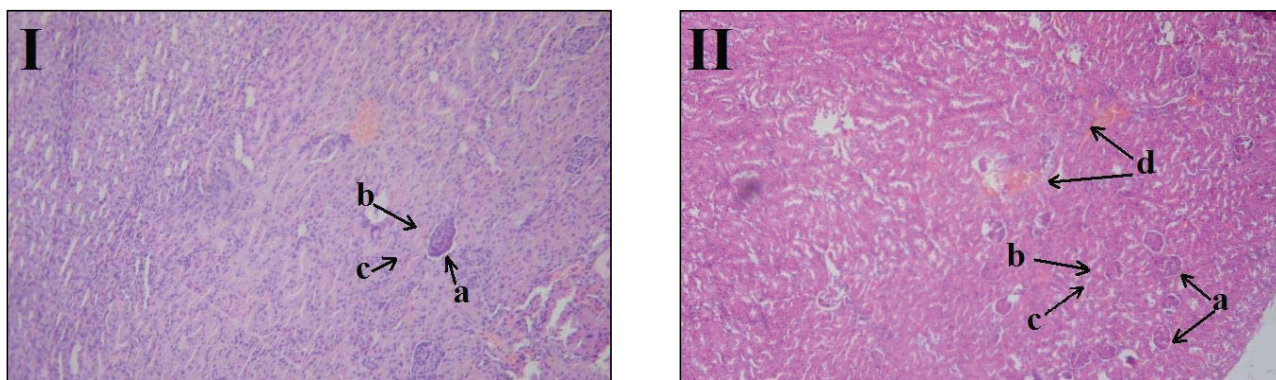


Рис. 1 Мікрофотографія нирок інтактних тварин (I) і тварин, яким вводили sPt (II): a – клубочок; b – проксимальний каналець; c – дистальний каналець; d – судина; збільшення $\times 10$

подібними до дії таких нефротоксикантів, (наприклад, як CCl_4), який ушкоджує ниркові тканини шляхом утворення вільних радикалів [3].

У цих зразках тканини виявлено розширення капілярів, нерівномірно повнокровні гломерули, поодинокі ділянки звуження прямих каналців, помірно виражена дистрофія епітелію проксимальних і дистальних каналців із поодинокими некрозами. Такі зміни є ознакою токсичного ушкодження нефроцитів, що підтверджує дані про те, що ці ділянки є найчутливішими до дії sPt порівняно з іншими ділянками нефрону [40].)

Однчасне застосування Re з sPt зменшує токсичну дію останнього, що проявляється у зменшенні кількості повнокровних ділянок і відсутності патологічних змін у клітинах нирок (рис. 2, II). Кіркова й мозкова речовина мають чіткі контури плазматичних мембран клітини, епітелій звивистих каналців також знаходиться в межах норми.

Такі морфологічні картини тканин відповідають даним дослідження

функціонального стану нирок за біохімічними і фізіологічними показниками.

Отже, ріст пухлини та застосування sPt спричинюють виражене пошкодження нирок щурів, що проявляється у збільшенні відносної маси органа, зниженні відносної реабсорбції води, клубочкової фільтрації, розвитку протеїнурії та ензимурії, що, вірогідно, відбувається за рахунок збільшення проникності плазматичних мембран. Збільшення активності ГГТФ і ЛДГ у сечі є наслідком ушкодження гломерулярного (ЛДГ) і проксимального (ГГТФ) апаратів нирок. Біохімічні та гістологічні дослідження вказують на токсичне ураження нирок у разі використання sPt. Застосування [Re]nl знижує токсичний вплив пухлини і sPt на нирки і зберігає ці показники в межах норми. Введення Re попереджає ушкодження гломерулярного і каналцевого апарату нирок і виявляє вираженіший захисний ефект від токсичної дії sPt у наноліпосомах змішаного складу при співвідношенні компонентів 4 : 1.

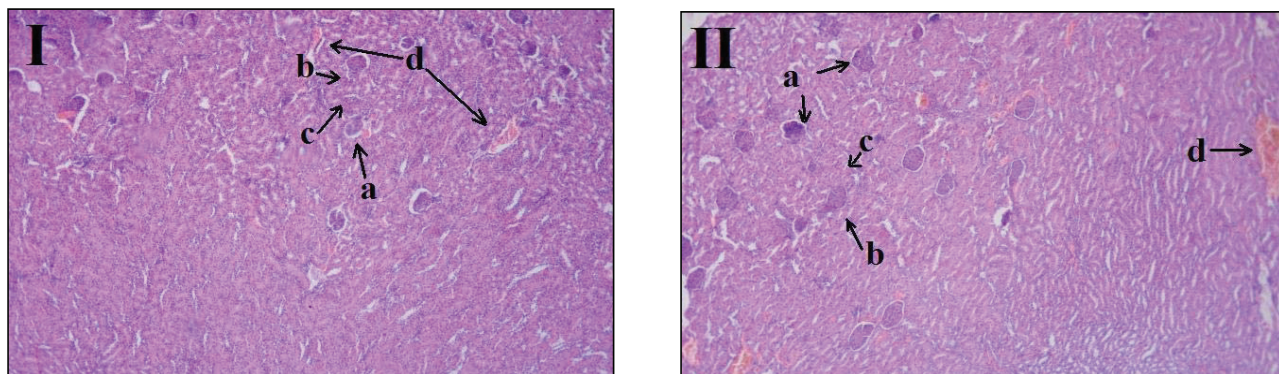


Рис. 2 Мікрофотографія нирок тварин, яким вводили Re (I) і систему Re-Pt (II): a – клубочок; b – проксимальний каналець; c – дистальний каналець; d – судина; збільшення $\times 10$

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОЧЕК КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИТОСТАТИКОВ

С. А. Бабий¹, Т. А. Лоскутова²,
Н. И. Штеменко¹

¹Днепропетровский национальный университет
имени Олеса Гончара, Украина;
e-mail: babiy_s@meta.ua;

²Днепропетровская государственная
медицинская академия, Украина

Установлено, что развитие карциномы Герена Т8 и введение цисплатина приводит к повреждению почек крыс, что проявляется в увеличении относительной массы почек, протеинурии, изменении активности γ -глутамилтрансферазы и лактатдегидрогеназы в гомогенате почек и моче, снижении относительной реабсорбции и клубочковой фильтрации. Введение нанолипосомных форм кластерных соединений рения приводит к нормализации вышеуказанных показателей и снижению токсического действия цисплатина на почки, что подтверждается биохимическими и морфологическими исследованиями.

Ключевые слова: почки, кластерные соединения рения, цисплатин, противоопухолевые препараты, нефротоксическое действие.

CHANGES OF THE STATE OF RAT KIDNEYS UNDER GUERIN CARCINOMA DEVELOPMENT AND USE OF CYTOSTATICS

S. A. Babiy¹, T. F. Loskutova²,
N. I. Shtemenko¹

¹Oles Gonchar Dnipropetrovsk
National University, Ukraine;

²Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;
e-mail: babiy_s@meta.ua

Summary

It was shown that development of the Guerin carcinoma and introduction of cisplatin led to the damage of the kidneys of rats that was confirmed by a relative increase of weight, proteinuria, change of γ -glutamyl transpeptidase and lactate dehydrogenase activity in the urea and tissue homogenates of the kidneys, by a decrease of relative reabsorption and glomerular filtration. Introduction of nanoliposomal forms of the rhenium cluster compounds led to normalization of above mentioned diagnostic indexes and to reduction of the toxic cisplatin

influence that was confirmed by biochemical and morphological investigations.

Key words: kidneys, cluster rhenium compounds, cisplatin, antitumor compounds, nephrotoxicity.

1. Shtemenko N. I. // Chem. & Biodiv. – 2008. – N 5. – P. 1660–1667.
2. Shtemenko A. V., Collery P., Shtemenko N. I. et al. // Dalton Trans. – 2009. – 26. – P. 5132–5136.
3. Бабій С. О., Дьомшина О. О., Трушенко О. С., Штеменко Н. І. // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2010. – 3. – С. 94–101.
4. Івчук В. В., Полішко Т. М., Голіченко О. М., Штеменко О. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, № 3. – С. 83–91.
5. Shtemenko N. I., Collery P., Shtemenko A. V. // Anticanc. Resear. – 2007. – 27. – P. 2487–2492.
6. Levi J., Jacobs C., Kalman S. M., McTigue M. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1980. – 213, N 3 – P. 545–550.
7. Raab W. P. // Clin. Chem. – 1972. – 18, N 1. – P. 5–25.
8. Охрименко С. М., Гур'єва Н. Ю., Каліман П. А. // Вісн. Харк. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2005. – 1–2, № 709. – С. 56–60.
9. Shtemenko A. V., Kotel'nikova A. S. // Isvest. Acad. of Scienc. of USSR, Chem. – 1980. – 11. – P. 2630–2631.
10. Єгорова Д. Є. Взаємодія біядерних кластерів ренію(III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул. Автореф. дис. ... канд. хім. наук. – Дніпропетровськ, 2010. – 18 с.
11. Тимофеевский А. Д. Модели и методы экспериментальной онкологии. – Москва: Медгиз, 1960. – 245 с.
12. Taylor S. K. // Med. Hypothesis. – 2003. – N 1. – P. 89–93.
13. Meerson F. Z., Evstigneeva M. E., Ustinova E. E. // Pat. Physiol. Exp. Ther. – 1983. – N 5. – P. 25–29
14. Берхин Е. Б., Иванов Ю. И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. – Барнаул.: Алтайск. кн. изд., 1972. – 199 с.
15. Yao X., Panichpibal K., Kurtzman N., Nugent K. // Am. J. Med. Scin. – 2007. – 334, N 2 – P. 115–124.
16. Лакін Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.

17. Tokunaga J., Kobayashi M., Kitagawa A. et al. // Biol. Pharm. Bull. – 1996. – **19**, N 11. – P. 1451–1456.
18. Yasuno K., Ishihara S., Saito R., Ishikawa M. et al. // J. Vet. Med. Sci. – 2010. – **72**, N 10. – P. 1319–1327.
19. Schnellmann R. G. // J. Tox. Environ. Health. – 1998. – N 1. – P. 1–90.
20. Coe F. L., Korty P. R. // Amer. J. Pathol. – 1967. – **213**, N 6. – P. 1585–1592.
21. Zafar M., Naqvi N. // Int. J. Morphol. – 2010. – **28**, N 1. – P. 135–142.
22. Eknoyan G. // Nefrolog. – 2011. – **31**, N 4. – P. 397–403.
23. Hostetter T. H. // Annu. Rev. Physiol. – 1995. – **57**: 263–278.
24. Vaidya V. S., Ramirez V., Ichimura T. et al. // Am. J. Physiol Renal Physiol. – 2006. – **290**, N 1. – P. 517–529.
25. Kawai Y., Taniuchi S., Okahara S. et al. // Biol. Pharm. Bull. – 2005. – **28**, N 8. – P. 1385–1388.
26. Pal S., Sadhu A. S., Patra S., Mukherjea K. // J. Exp. Clin. Canc. Res. – 2008. – **27**, N 68. – P. 98–112.
27. Gasting D., Garba I. H., Adoga G. I. // Ind. J. Clin. Biochem. – 2006. – **21**, N 2. – P. 42–48.
28. Lisowska-Myjak B. // Blood Purif. – 2010. – **29**. – P. 357–365.
29. Loh A. H. L., Cohen A. H. // Ann. Acad. Med. Singapore. – 2009. – **38**. – P. 240–250.
30. Han W. K. // Nephrol. Rounds. – 2008. – **6**, N 4. – P. 304–309.
31. Pather L. // Pediatr. Nephrol. – 2007. – **39**. – P. 32–47.
32. Roncal C. A., Mu W., Croker B. et al. // Am. J. Physiol. Ren. Physiol. – 2007. – **292**. – P. 116–122.
33. Sirwal I. A., Banday K. A., Reshi A. R. et al. // J. K. Scien. – 2004. – **6**, N 3. – P. 121–124.
34. Levey A. S., Bosch J. P., Lewis J. B. et al. // Ann. of Intern. Med. – 1999. – **130**. – P. 461–470.
35. Takano M., Nakanishi N., Kitahara Y. et al. // Kidn. Intern. – 2002. – **62**. – P. 1707–1717.
36. Ze-Jun Lie, Wei-cong Peng, Xin Yang et al. // J. Chromatog. – 2003. – **793**. – P. 405–412.
37. Teller J. K., Fahien L. A., Davis J. W. // J. Biol. Chem. – 1992. – **267**, N 15. – P. 10423–10432.
38. Chaudhury K., Das T., Chakravarty B., Bhattacharyya A. // Fertil. Steril. – 2005. – **83**, N 1. – P. 104–109.
39. Tate S. S., Grau E. M., Meister A. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – **76**, N 6. – P. 2715–2719.
40. Townsend D. M., Deng M., Zhang L. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2003. – **14**. – P. 1–10.
41. Sheikh-Hamad D. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2008. – **295**. – P. 42–43.
42. Trof R. J., Maggio F. D., Leemereis J., Groeneveld A. B. J. // Shock. – 2006. – **26**, N 3. – P. 245–253.
43. Хоменко Л. А. // Укр. біохім. журн. – 1978. – **50**, № 1. – С. 91–98.

Отримано 08.12.2011