

ВПЛИВ ДОКСОРУБІЦИНУ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ І РОЗПОДІЛ NSAM В ЇХ ЦЕРЕБРАЛЬНИХ СТРУКТУРАХ

Надійшла 01.06.17

Показано, що в умовах розвитку експериментальної доксорубіциніндукованої кардіоміопатії в структурах мозку щурів відбуваються значні зміни розподілу нейронних молекул клітинної адгезії (NSAM). Це супроводжується зниженням інтенсивності локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності тварин і посиленням проявів стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: доксорубіцин, NSAM, мозок, серце.

ВСТУП

Доксорубіцин – антрацикліновий антибіотик, який має виражену цитостатичну дію. Цей препарат використовується для хіміотерапії злоякісних новоутворень різної локалізації (включаючи пухлини головного мозку) та лейкозів. Доксорубіцин знижує інвазивність малігнізованих клітин [1, 2]. Для антрациклінових антибіотиків, до котрих відноситься доксорубіцин, є характерними досить важкі побічні ефекти, здатні призводити до формування низки патологічних станів. Найважчим серед таких станів вважається кардіопатія. Механізми антрациклінової токсичності до кінця ще не вивчені; є підстави вважати, що в їх число входять окисний стрес, пошкодження ДНК, розвиток дисфункції мітохондрій, індукція апоптозу та ін. [3]. Дія доксорубіцинової терапії на стан та функції головного мозку вивчена вельми слабо. Вважається, що антрациклінові препарати не можуть проникати в мозок, оскільки вони нездатні перетинати гемато-енцефалічний бар'єр [4]. Антрациклінова терапія, однак, може супроводжуватися негативними впливами на когнітивну сферу. В цій проблемі поки що залишається багато нез'ясованих питань.

У рамках цільової стратегії доставки ліпосомних ліків до NSAM-експресуючих пухлин пропонується використовувати антитіла до нейронних молекул клітинної адгезії (NSAM) [2]. До сьогодні, проте, немає жодної інформації, яким чином доксорубіцин впливає на розподілення NSAM у мозку в нор-

мальних умовах (без наявності неоплазій), а також чи впливає цей препарат на поведінкові феномени у ссавців. Тому ми намагались оцінити вплив введення доксорубіцину на розподіл водорозчинної та мембранної форм NSAM у різних відділах головного мозку щурів (а також у крові та серці) та виявити можливі кореляції між характером розподілу NSAM і поведінковими феноменами у дослідних тварин.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар масою 210 ± 50 г. Тварини були розподілені на дві групи. До першої увійшли контрольні тварини ($n = 8$), що отримували фізіологічний розчин внутрішньоочеревинно один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів. Тваринам другої групи вводили доксорубіцин у дозі 1.0 мг/кг маси тіла (доксорубіцин-КМП; ВАТ «Київмед препарат», Україна) також внутрішньоочеревинно за аналогічною схемою (один раз на тиждень). Усіх тварин утримували в стандартних умовах віварію; вони мали вільний доступ до води та їжі.

Протягом експерименту у тварин реєстрували поведінкові феномени в умовах тесту «Відкрите поле» [5]. Оцінювали зміни маси тіла, рівень виживання, інтенсивність локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності, а також поведінкові прояви, пов'язані зі стресом.

Тварин виводили з експерименту під наркозом (тіопентал натрію, 60 мг/кг). Мозок розділяли на частини та гомогенізували їх у буфері, що вміщував

¹Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара (Україна).
Ел. пошта: kristalxx@yandex.ru (Я. В. Бабець);
shakova_g@ukr.net (Г. О. Ушакова).

25 мМ трис-НСІ (рН 7.4), 1 мМ етилендіамінтетраацетату, 2 мМ дитіотреїтолу, 0.2 мМ фенілметилсульфофлуориду (ФМСФ) та 0.01 % натрію азиду (співвідношення тканина–буфер 1:10). Для виділення мембранної фракції білків використовували зазначений буфер з додаванням 2.0 % тритону X-100. Використані реагенти були придбані у фірмі «Sigma» (США).

Вміст NCAM в отриманих фракціях досліджували за допомогою імуоферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл до NCAM («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США); методика відповідає інструкціям виробника. Виміри здійснювали за допомогою спектрофотометра «Anthos 2010» (Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм «Statwin» та «Excel», використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та *t*-критерій Ст'юдента. Вірогідним вважали міжгрупові відмінності з $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження впливу доксорубіцину на розподіл NCAM у головному мозку були обрані відділи останнього, функції котрих тісно пов'язані з контролем рухової активності (мозочок), реалізацією сенсорних функцій (соматосенсорна кора великих півкуль, таламус/гіпоталамус), формуванням пам'яті та пізнавальною діяльністю (гіпокамп). Курсове введення доксорубіцину і розвиток у щурів кардіоміопатії внаслідок інтоксикації цим препаратом негативно впливали на фізіологічні показники щурів у відкритому полі. У щурів контрольної групи інтенсивність локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності (кількість пересічених квадратів та стійок відповідно) протягом чотирьох тижнів експерименту знижувалась у середньому приблизно вдвічі. Така динаміка є очікуваною; вона зумовлюється адаптацією до умов тестування та хабітуацією. У щурів, котрим вводили доксорубіцин, пригнічення моторної та дослідницької активності носило драматичний характер; на третю-четверту добу відповідні поведінкові прояви послаблювалися більше ніж на порядок і у деяких тварин гальмувалися аж до їх практичної відсутності (рис. 1). Паралельно відбувалося збільшення показників, що характеризують рівень стресу.

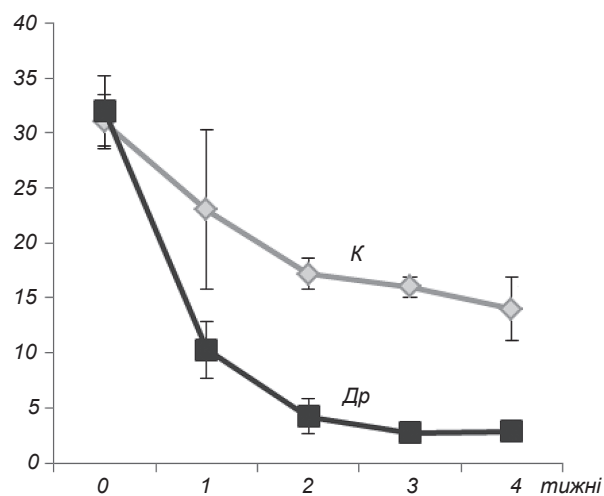


Рис. 1. Динаміка локомоторної активності щурів у відкритому полі.

По осі абсцис – тривалість експерименту, тижні; по осі ординат – середня кількість пересічених квадратів протягом інтервалу спостереження. *К* – контрольні щури; *Др* – щури, що отримували доксорубіцин (1 мг/кг один раз на тиждень) внутрішньочеревинно ($n = 8$ в обох групах).

Зміни нейропластичності та інтенсивності міжклітинних комунікацій у головному мозку можна оцінити за даними аналізу розподілу в церебральних структурах NCAM – багатофункціонального глікопротеїну, що опосередковує адгезію по типу “клітина–клітина” через гомофільну трансвзаємодію і бере участь у численних гетерофільних інтра- та екстрацелюлярних взаємодіях білків [6]. Згідно з результатами альтернативного сплайсингу гетероядерної РНК, існують декілька ізоформ даного глікопротеїну. NCAM 180 та NCAM 140 мають великі внутрішньоклітинні домени, тоді як NCAM 120 з’єднується з мембранами за допомогою глікофосфатидилінозитольного зв’язку. Мембранні форми NCAM можуть переходити в розчинний стан за допомогою ектодоменового шедінгу, опосередкованого металопроїназами [7]. Для дослідження розподілу NCAM у перебігу наших експериментів були екстраговані дві фракції білків мозку – мембранна та водорозчинна/цитозольна. Кількісні вимірювання NCAM у цих фракціях визначали вміст мембранної та розчинної форм NCAM відповідно.

В умовах дії доксорубіцину протягом чотирьох тижнів у мозку відбувалися істотні зміни розподілу NCAM у різних відділах мозку (рис. 2, *А, Б*). У корі великих півкуль рівень мембранної форми NCAM

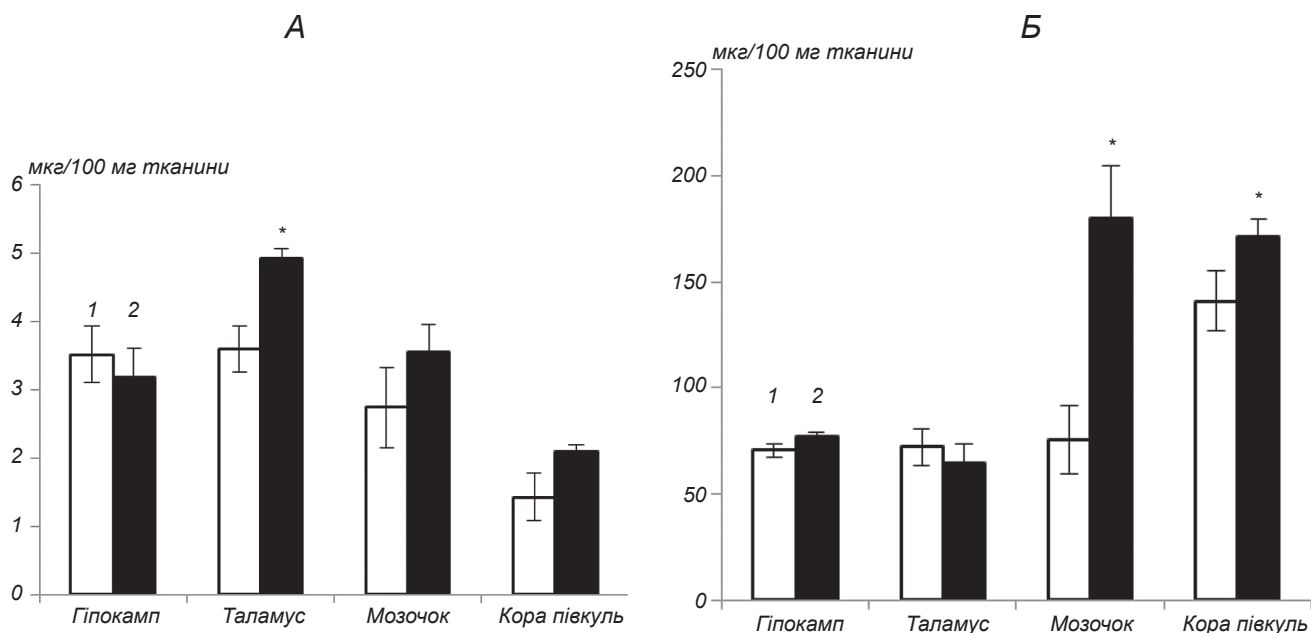


Рис. 2. Рівні розчинної (А) та мембранної (Б) форм нейронних молекул клітинної адгезії (NCAM) у різних відділах мозку щурів. 1 – контрольні щури (отримували фізіологічний розчин); 2 – тварини, що отримували доксорубіцин (1 мг/кг один раз на тиждень) протягом чотирьох тижнів ($n = 8$).

перевищував середнє контрольне значення на 22 %, а в мозочку збільшення даної форми NCAM було більше ніж двохразовим (на 138 % порівняно з показником у контрольній групі тварин). У таламусі та гіпокампі вірогідних змін вмісту мембранної форми NCAM під дією доксорубіцину не відбувалося. Підвищення кількості мембранної форми NCAM у мозочку щурів при курсовому введенні даного препарату корелювало зі змінами в їх поведінці – зменшенням інтенсивності локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності; коефіцієнти кореляції склали -0.96 та -0.72 відповідно. Під впливом доксорубіцину змінювався вміст розчинної форми NCAM. У корі, таламусі та мозочку кількість цієї форми перевищувала контроль на 25–45 %, тоді як у гіпокампі відбувалося неістотне зменшення цього показника.

Раніше ми спостерігали, що курсове введення доксорубіцину в дозі 1 мг/кг маси за вказаною вище схемою призводить у щурів до зниження індексу маси серця на 38 %; змінюється форма серця та відбувається порушення стану міокарда. Це пов'язано з розвитком інтенсивної кардіоміопатії в експериментальних тварин [8].

Очевидно, розвиток доксорубіциніндукованої кардіоміопатії значною мірою пригнічує кровообіг

у мозку та погіршує його забезпечення киснем і поживними речовинами. Це істотно впливає на адгезивні властивості нервових клітин. Найбільші зрушення відбуваються в мозочку порівняно з іншими структурами мозку.

Підвищення кількості розчинної форми NCAM (рис. 2, А), можливо, досягається за рахунок підвищення експресії сигнальних форм NCAM або за рахунок розщеплення мембранних ізоформ NCAM за допомогою позаклітинних металопротеїназ або протеїназозалежного шедінгу [9]. В умовах дії доксорубіцину протягом чотирьох тижнів у мозочку щурів спостерігалось вірогідне збільшення співвідношення розчинної та мембранної форм NCAM на 84 % порівняно з тим самим показником у контрольній групі. При цьому в таламусі та корі великих півкуль спостерігалися протилежні зміни – зменшення даного співвідношення.

Вміст NCAM в елементах периферичної нервової системи є меншим, ніж у ЦНС, але згаданий показник є функціонально важливим. Експресія NCAM у серці регулюється регіонально, особливо при формуванні серця в період ембріонального розвитку. NCAM у серці може виконувати протекторну роль; рівень цього білка в умовах низки захворювань серця змінюється. За літературними даними, гіпер-

експресія NCAM у серці є специфічною тільки для ішемічного пошкодження; вона не спостерігається в разі інших вад серця, включаючи застійну кардіоміопатію, гіпертрофічну кардіоміопатію, міокардит та саркоїдоз [10].

З використанням гістохімічних методів ми підтвердили істотність пошкодження кардіоміоцитів щурів під дією доксорубіцину [8]; рівень NCAM у фракції розчинних білків серцевого м'яза підвищувався на 280 % (17.4 ± 4.1 мкг/г тканини). При цьому не відбувалося вірогідних змін вмісту NCAM у плазмі крові дослідних груп щодо норми. Інші дослідники також повідомляли про зміни вмісту NCAM у серцевому м'язі в умовах його пошкодження, причому даний показник характеризувався великою варіабельністю [10].

Таким чином, результати нашого дослідження свідчать про те, що курсове введення доксорубіцину призводить до розвитку кардіоміопатії. Токсичні ефекти даного препарату зумовлюють пригнічення локомоторної та орієнтувально-дослідницької активності піддослідних щурів та супроводжуються значними проявами стресу. Курсове введення доксорубіцину в дозі 1 мг/кг протягом чотирьох тижнів викликає зміни розподілу як розчинної, так і мембранної форми NCAM, причому такі зміни в різних відділах мозку щурів демонструють певну специфіку. Це, в свою чергу, впливає на регуляцію синаптичної пластичності в різних структурах мозку. Доксорубіцин також впливає на вміст NCAM у м'язі серця на тлі збереження нормального рівня даного білка в плазмі крові.

Дослідження виконувалося відповідно до положень Європейської Конвенції про захист тварин, які використовуються в експериментах (86/609/ЕЕС, 1966, Страсбург), та нормативів Комітету з біоетики Дніпровського національного університету ім. Олеся Гончара.

Автори даної роботи – Я. В. Бабець та Г. О. Ушакова – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо

комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R. A. Blaheta, F. H. Daher, M. Michaelis, et al., "Chemoresistance induces enhanced adhesion and trans endothelial penetration of neuroblastoma cells by down-regulating NCAM surface expression," *BMC Cancer*, **6**, 294-307 (2006).
2. C. Grange, S. Geninatti-Crich, G. Esposito, et al., "Combined delivery and magnetic resonance imaging of neural cell adhesion molecule-targeted doxorubicin-containing liposomes in experimentally induced kaposi's sarcoma," *Cancer Res.*, **70**, No. 6, 2180-2190 (2010).
3. V. I. Franco, J. M. Henkel, T. L. Miller, et al., "Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines," *Cardiol. Res. Pract.*, **10**, 1-13 (2011).
4. G. Joshi, C. D. Aluise, M. P. Cole, et al., "Alterations in brain antioxidant enzymes and redox proteomic identification of oxidized brain proteins induced by the anti-cancer drug Adriamycin: Implications for oxidative stress-mediated chemobrain," *Neuroscience*, **166**, No. 3, 796-807 (2010).
5. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
6. T. Secher, "Soluble NCAM structure and function of the neural cell adhesion molecule NCAM," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **663**, 227-242 (2010).
7. X. Mao, T. Schwend, and G. W. Conrad IOVS, "Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, No. 3, 1234-1243 (2012).
8. Ю. А. Гордієнко, Я. Бакланова (Я. Бабець), М. В. Коваленко та ін., "Зміни фізіологічних та біохімічних показників у щурів з доксорубіциніндукованою кардіопатією на тлі застосування препаратів з антиоксидантною дією", *Біологія тварин*, **14**, № 1/2, 74-79 (2012).
9. K. Hayashida, A. H. Bartlett, Y. Chen, et al., "Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding," *Anat. Rec.*, **293**, No. 6, 925-937 (2010).
10. S. Gattelünner, C. Waller, G. Ertl, et al., "The overexpression of NCAM (CD56) in human hearts is specific for ischemic damage," *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, **88**, 246-251 (2004).