

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ, ОБЛАДАЮЩИХ РАЗЛИЧНЫМ НЕФРОТОКСИЧНЫМ ЭФФЕКТОМ

В.Т.БАХТЕЕВА, Е.М.ФОК, Е.А.ЛАВРОВА

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург

При исследовании действия двух противоопухолевых комплексов платины — цисплатина, обладающего нефротоксичным действием, и циклоплатамы — соединения, не поражающего почки, найдено, что через 3 часа после введения циклоплатамы содержание платины в почках почти в 2 раза меньше, чем после введения цисплатины. Различная динамика выхода соединений платины из почек приводит к выравниванию содержания платины через 5 дней после введения обоих препаратов. Содержание платины в ядрах, митохондриях и супернатанте относительно общего содержания в коре почки одинаково для обоих препаратов. Ослабление нефротоксического действия цисплатина предварительным введением хлористого холина или парааминогиппуровой кислоты не связано с меньшим уровнем платины в почках ни через 3 часа, ни через 5 дней после введения.

Ключевые слова: платина, нефротоксичность, побочные эффект, крыса.

Введение. Противоопухолевое действие ряда препаратов, в частности, цисплатина сопровождается развитием нефротоксичности. При использовании цисплатина наблюдается уремия, увеличение массы почек, возрастание в них содержания воды и сухого вещества, падение диуреза [1, 2]. Для устранения нефротоксического эффекта были предприняты успешные попытки синтеза новых противоопухолевых препаратов, содержащих платину, но не обладающих нефротоксичностью [3]. Одним из таких препаратов является циклоплатам. Сравнение действия цисплатина и циклоплатамы показало, что снижение нефротоксического эффекта не связано с меньшим накоплением платины в почке через 5 дней после введения препаратов [4]. Оставалось неясным, почему при одинаковом содержании платины в почке один препарат приводит к поражению органа, а второй — нет. Возможными причинами могло быть различное поступление соединений платины в почку через короткий срок после введения цисплатина или циклоплатамы, а также неодинаковое распределение комплексов платины обоих препаратов по субклеточным фракциям клеток почки. Невыясненной оказалась и роль накопления платины в почке при снижении нефротоксического эффекта цисплатина путем введения ряда органических кислот и оснований, таких, как хлористый холин и пара-аминогиппуровая кислота (ПАГ). В связи с этим задачей настоящей работы явилось определение содержания платины в почках 1) через 3 часа, 3 и 5 суток после введения эквивалентных количеств цисплатина и циклоплатамы; 2) в ядрах, митохондриях и супернатанте клеток почки после введения этих препаратов; 3) при снижении нефротоксического действия цисплатина путем предварительного введения хлористого холина и ПАГ.

Методика. Опыты проводились на самках крыс линии Вистар массой около 160 г. Цисплатин и циклоплатам были синтезированы в Институте общей и неорганической химии им. Н.С.Курнакова РАН П.А.Чельцовым, которому авторы приносят глубокую благодарность. Доза цисплатина и циклоплатамы составляла 17 мкмоль/кг массы тела, что соответствовало 5 мг/кг для цисплатина и 7,2 мг/кг для циклоплатамы. Оба препарата растворяли в 0,85% р-ре NaCl и вводили внутрибрюшинно. Через 3 часа, 3 или 5 суток животным давали легкий эфирный наркоз, декапитировали, собирали кровь и быстро извлекали почки. Почки взвешивали, освобождали от капсулы и выделяли кору. Часть коры использовали для определения содержания платины, а часть — весом 200–300 мг — измельчали ножницами и переносили в гомогенизатор. Раствор для гомогенизации содержал 225 мМ маннита, 75 мМ сахарозы, 0,04 М трис HCl, pH 7,2. Соотношение ткань:среда составляло 1:10. Все операции проводили при низких температурах. Путем дифференциального центрифугирования получали следующие фракции — ядерную (10 мин при 700–900 g), митохондриальную (10 мин при 12000 g) и супернатант. В гомогенате и полученных фракциях определяли содержание белка [5]. Полученные фракции переносили в кварцевые пробирки, высушивали содержимое при 105°C, озоляли азотной кислотой при 90°C и измеряли концентрацию платины в графитовых

кюветах на атомном адсорбционном спектрофотометре фирмы "Хитачи". Пробы для определения платины в коре и целой почке подготавливали аналогично пробам для определения платины во фракциях. Содержание платины во фракциях рассчитывали на грамм белка, а в коре и в целой почке — на сухой и влажный вес.

Для снижения нефротоксического действия цисплатина использовали хлористый холин и ПАГ по схеме, описанной ранее [1]. В сыворотке крови определяли содержание мочевины с тиосемикарбазидом и концентрацию осмотически активных веществ на миллиосмометре МТ-2.

Результаты и обсуждение. Через 3 часа после введения крысам эквимольных количеств цисплатина и циклоплатам концентрация мочевины в сыворотке крови, масса почки и содержание в ней воды не отличались от соответствующих показателей контрольных животных (табл. 1). Спустя 3 суток после введения цисплатина четко выявилось нефротоксическое действие препарата — концентрация мочевины в сыворотке крови возросла в 4,8 раза. Через 5 суток содержание мочевины в сыворотке увеличилось почти в 13 раз, на 55% возросла масса почек, на 16% повысилось содержание в них воды. В отличие от цисплатина циклоплатам не вызывал изменения изученных показателей в течение всего исследуемого периода (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация мочевины в сыворотке крови (ммоль/л), масса почки (мг/100 г массы тела) и содержание воды (г H₂O/г сухого веса) в коре почки крыс в различные сроки после введения цисплатина и циклоплатам

Условия опыта		Мочевина	Масса почки		H ₂ O почки
			левая	правая	
3 часа	контроль	6,0±0,6 (6)	332±13 (7)	352±13 (6)	3,07±0,04 (17)
	цисплатин	7,8±0,0(4)	337±6 (4)	352±12 (4)	3,10±0,07 (15)
	циклоплатам	5,8±1,3 (4)	344±8 (6)	353±6 (4)	3,00±0,06 (16)
3 сут.	цисплатин	28,7±5,0** (5)	350±22 (6)	362±24 (6)	3,23±0,10 (15)
	циклоплатам	6,4±1,0(4)	354±8 (5)	361±15 (6)	3,15±0,04 (16)
5 сут.	цисплатин	77,7±20,2 (6)	519±16***	543±11*** (6)	3,57±0,06*** (16)
	циклоплатам	5,7±1,1 (6)	353±13 (6)	359±11 (6)	2,99±0,05 (10)

Примечание. 1. Цифры в скобках обозначают количество исследований;

2. ** — $p < 0,01$;

*** — $p < 0,001$ относительно контроля.

Таблица 2

Содержание платины в коре почек крыс в различные сроки после введения цисплатина и циклоплатам

Условия опыта		Платина, мкг/г	
		вл. веса	сух. веса
3 часа	цисплатин (6)	12,6±1,5	49,2±6,6
	циклоплатам (6)	5,6±1,3**	22,4±5,1**
3 сут.	цисплатин (6)	10,1±1,5	42,1±6,4
	циклоплатам (5)	5,6±0,5*	23,3±2,0*
5 сут.	цисплатин (5)	5,4±1,1 ⁺ ■	23,5±3,2 [■]
	циклоплатам (6)	6,6±0,5	26,8±2,1

Примечание.

1 * — $p < 0,05$;

** — $p < 0,01$, сравнение действия цисплатина и циклоплатам в один и тот же срок после инъекции;

2 ■ — $p < 0,05$;

■ — $p < 0,01$, сравнение действия одного препарата через 3 часа и 5 суток после инъекции;

3 + — $p < 0,05$, сравнение действия одного препарата через 3 суток и 5 суток после инъекции.

Определение содержания платины в коре почек крыс через 3 часа после введения обоих препаратов выявило существенную разницу в поступлении соединений платины в почку — при введении цисплатина содержание платины в коре почки более чем в 2

раза было выше, чем при введении эквимольного количества циклоплатама (табл. 2). Через 3 суток это соотношение почти не изменилось, а через 5 суток уровень платины в почках крыс, получивших цисплатину и циклоплатам, был практически одинаков.

Следует отметить различную динамику изменения содержания соединений платины в коре почки: при введении цисплатина к 5 суткам количество платины в коре почки снижалось почти в 2 раза, тогда как при введении циклоплатама уровень платины в почке практически не изменялся во времени (табл. 2).

Таблица 3

Содержание платины (мкг/г белка) в субклеточных фракциях коры почек крыс в различные сроки после введения цисплатина и циклоплатама

Вариант опыта		Фракции		
		ядра	митохондрии	супернатант
3 часа	цисплатин	69,5±11,6 (11)	97,6±16,5 (9)	116,6±11,0(11)
	циклоплатам	17,0±8,3 **	37,1±13,9 * (12)	47,8±5,5* (10)
3 сут.	цисплатин	47,7±6,2 (7)	69,9±9,7 (10)	103,0±13,3 (10)
	циклоплатам	20,6±6,8* (12)	22,0±4,3**(12)	48,9±6,1* (12)
5 сут.	цисплатин	15,9±4,9 *** (11)	29,2±7,9 *** (11)	69,0±9,1 (11)
	циклоплатам	7,8±3,2 (11)	22,0±6,8 (12)	37,9±4,8 ** (12)

Примечание: цифры в скобках обозначают количество исследований; остальные обозначения как в табл. 2.

Таблица 4

Распределение платины (% от содержания в коре почки) по субклеточным фракциям почки крыс

Вариант опыта		Фракции		
		ядра	митохондрии	супернатант
3 часа	цисплатин (12)	18,1±4,5	22,7±2,7	64,2±6,1
	циклоплатам (8)	16,8±5,5	23,1±4,7	63,0±11,8
3 сут.	цисплатин (11)	11,1±2,6	22,7±3,0	70,5±11,2
	циклоплатам (10)	13,0±4,3	14,5±4,2	65,7±7,0
5 сут.	цисплатин (8)	19,1±6,6	20,0±6,9	67,8±14,0
	циклоплатам (6)	20,7±10,0	19,6±3,9	51,8±4,9

Примечание: достоверных отличий между двумя препаратами нет.

Определение платины в субклеточных фракциях коры почек показало, что во все исследованные сроки после введения обоих препаратов содержание платины в расчете на грамм белка выше всего в супернатанте, ниже — в митохондриях и еще ниже в ядрах (табл. 3). Через 3 часа после введения выявилась значительная разница — содержание платины во всех фракциях, полученных из почек животных после введения цисплатина, значительно превышало таковое после введения циклоплатама (табл. 3). Такая же картина наблюдалась и через 3 суток после введения препаратов. Через 5 суток содержание платины в ядрах и митохондриях существенным образом не различалось, лишь для супернатанта разница была достоверной. Так же как и в целой коре, содержание платины в исследованных фракциях коры почек крыс, которым вводили циклоплатам, оставался примерно на одном уровне во все исследованные сроки, тогда как с течением времени после введения цисплатина платина равномерно убывала и из ядер, и из митохондрий, и из супернатанта (табл. 3). При расчете относительного распределения платины по фракциям в процентах от общего количества, поступившего в кору почки, оказалось, что оно примерно одинаково как для обоих препаратов, так и для различных сроков после их введения (табл. 4). Иными словами, платина цисплатина и циклоплатама, войдя в почечную клетку, распределяется в ней сходным образом — примерно равное количество поступает в ядра и митохондрии, а остальная часть остается в цитозоле. Таким образом можно заключить, что разница в действии

цисплатина и циклоплатам не связана с различным распределением комплексов платины по субклеточным фракциям. Различие в действии цисплатина и циклоплатам коррелирует с разным поступлением платины в почку через 3 часа, но не через 5 суток после введения препаратов. Эти данные позволили по-новому посмотреть на предыдущие исследования нашей лаборатории, в которых при изучении способов снижения нефротоксического действия цисплатина было показано, что предварительное введение некоторых органических кислот и оснований приводит к значительно меньшему поражению почек [1]. Содержание платины в этих опытах определялось на 5 сутки, когда нефротоксический эффект цисплатина проявлялся в наибольшей степени. В этот срок содержание платины в почках было одинаковым у животных и с существенным, и с незначительным поражением почек. Данные, полученные в настоящей работе, показали необходимость определения содержания платины через 3 часа после введения цисплатина и веществ, ослабляющих его нефротоксическое действие.

Для решения этой задачи были поставлены опыты с предварительным введением хлористого холина и ПАГ, ослабляющих нефротоксическое действие цисплатина. В экспериментах для определения платины бралась целая почка, а срок исследования составлял 3 часа и 5 суток после инъекции препаратов. Нефротоксическое действие цисплатина четко выявлялось через 5 суток — в сыворотке крови резко возрастала концентрация мочевины и осмотически активных веществ, увеличивалась как влажная, так и сухая масса почки, тогда как через 3 часа после воздействия исследованные показатели не отличались от соответствующих контрольных величин (табл. 5). Так же четко проявилось и защитное действие холина и ПАГ — содержание мочевины в сыворотке крови в этих опытах было почти в 3 раза ниже, чем при введении одного цисплатина. Холин и ПАГ, как и было показано ранее, несколько снижали, но не предотвращали изменения состояния почечной ткани (табл. 5). Однако защитное действие холина и ПАГ не сопровождалось снижением поступления платины в почку через 3 часа после введения — содержание платины в почке было практически одинаковым у животных с ослабленным и неизменным нефротоксическим эффектом цисплатина (табл. 5). Через 5 суток во всех сериях экспериментов платины в почках стало меньше почти в одинаковой степени. Таким образом, результаты проведенных опытов ясно показали, что при ослаблении действия нефротоксического соединения платины степень ее накопления в почке не связана со степенью поражения органа.

Таблица 5

Концентрация мочевины (ммоль/л) и осмоляльность (мосм/л) сыворотки крови, влажная и сухая масса почки (мг/100 г массы тела) и содержание платины (мкг/г влажной и сухой массы почки) через 3 часа и 5 суток после введения препаратов

	Мочевина	Осмо- ляльность	Масса почки		Платина	
			влажная	сухая	влажной массы почек	сухой массы почек
Контроль	4,1±0,5	311±2	333±18	75,1±3,1		
3 часа						
Цисплатин (9)	5,1±0,4	311±1	336±12	78,0±2,5	9,3±0,5	40,3±2,0
Холин+цисплатин (9)	4,0±0,3	307±2	354±12	76,7±1,7	8,7±0,5	39,8±2,3
ПАГ+цисплатин (10)	4,8±0,4	307±2	363±11	81,9±2,6	8,1±0,3	36,1±1,3
5 суток						
Цисплатин (9)	25,6±9,0*	351±10**	545±28***	106,3±3,1***	6,2±0,4***	32,1±2,4**
Холин+цисплатин (9)	8,2±2,2	308±3***	462±26****	89,2±3,1****	7,4±0,4*+	38,1±1,8*
ПАГ+цисплатин (10)	8,8±1,6	316±3**	503±24***	92,7±3,1****	6,2±0,5**	33,4±2,1

Примечания: * — достоверность рассчитана по отношению к контролю;

+ — достоверность рассчитана по отношению к серии опытов с цисплатином для данного времени после введения препарата (3 часа или 5 суток);

— то же для одинакового сочетания препаратов, но разного времени воздействия (только для граф "Платина").

Итак, для решения задачи, в какой степени тяжесть развивающейся острой почечной недостаточности (ОПН) зависит от накопления соединений платины в почке, были выбраны два подхода. С одной стороны, анализировалось действие двух комплексов платины — токсичного и нетоксичного, а с другой — уменьшение нефротоксичности соединения путем введения органических кислот и оснований. Полученные результаты показали, что в первом случае происходит различное поступление соединений платины в почку через 3 часа после введения эквивалентных доз, а во втором — ослабление нефротоксического действия цисплатина не связано с меньшей аккумуляцией платины. Циклоплатам — не поражающий почки отечественный препарат платины — изучен сравнительно мало по сравнению с другим препаратом того же поколения — карбоплатином. Было показано, что платина из цисплатина и карбоплатина проникает в клеточные органеллы [6, 7, 8]. Данных по внутриклеточному распределению циклоплатам в доступной нам литературе не найдено.

В настоящее время установлено, что при ОПН, вызываемой нефротоксичными веществами, затрагивается множество процессов, протекающих в нормальных клетках [9]. Отмечалось, что при поражениях почки происходит увеличение концентрации внутриклеточного кальция и свободных радикалов. Увеличение содержания кальция меняет проницаемость клеточных мембран, состояние Са-зависимых ферментных систем, таких, как фосфолипазы и протеазы, что в свою очередь сопровождается изменением функций цитоскелетных белков. При введении цисплатина изменяется транспорт органических веществ на люминальной и контрлюминальной мембранах клеток почечных канальцев [10]. Увеличение содержания свободных радикалов, сопутствующее ОПН, приводит к повреждению белков, липидов и нуклеиновых кислот [11, 12]. Внутриклеточные изменения могут сопровождаться потерей высокоэнергетических метаболитических субстратов, таких, как АТФ, что, в свою очередь, приводит к дисфункции ионных насосов, обеспечивающих нормальный электролитный состав внутриклеточного содержимого. Происходят многочисленные изменения в состоянии почечной ткани и осуществлении функций почек — увеличивается количество воды, изменяется содержание ионов и сухого вещества, падает гломерулярная фильтрация и величина мочеотделения [1, 2]. С другой стороны, известно свыше десятка соединений, способных в значительной мере ослаблять нефротоксический эффект только одного вещества, поражающего почки — цисплатина. Среди этих соединений можно назвать столь разные, как органические кислоты и основания, тиокарбаматы, глюкокортикоиды, простагландины, антиоксиданты и др. Механизм защитного действия этих соединений во многих случаях остается неясным. В некоторых случаях, например, при защитном эффекте глицина [13] его действие связано как с увеличением кровотока [14], так и с уменьшением поступления платины в почки [15]. Анализ собственных данных и сведений, имеющих в литературе, позволяет заключить, что многообразие процессов, затронутых в патогенезе нефротоксикозов, обуславливает многообразие веществ, способных ослабить нефротоксическое действие цисплатина. Это заставляет предположить, что для каждого вещества или группы веществ может быть и свой механизм, с помощью которого осуществляется защита почки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наточин Ю.В., Резник Л.В., Бровцын В.К. и др. // Бюл. exper. биол. — 1989. — Т. 108, N 7. — С. 52-54.
2. Преснов М.А., Коновалова А.Л., Горбунова В.А. // Вестн. АМН СССР. — 1986. — N 12. — С. 79-89.
3. Ammer U., Natchin Yu., David C. et al. // Renal Physiol. Biochem. — 1993. — V. 16. — P. 131-145.
4. Choie D.D., del Campo A.A., Guaino A.M. // Toxicol. and Appl. Pharmacol. — 1980. — V. 55. — P. 245-252.
5. Heyman S.N., Rosen S., Silva P. et al. // Kidney Int. — 1991. — V. 40. — P. 273-279.
6. Heyman S.N., Spokes K., Egorin M.J., Epstein F.H. // Kidney Int. — 1993. — V. 43. — P. 1226-1228.
7. Li Q., Bowmer C.J., Yates M.S. // J. Pharm. Pharmacol. — 1995. — V. 47, N. 3. — P. 223-226.
8. Natchin Yu.V., Reznik L.V., Bakhteeva V.T. et al. // Compar. Biochem. Physiol. — 1989. — V. 94C, N. 1. — P. 115-120.
9. Paller M.C., Neumann T.V. // Kidney Int. — 1991. — V. 40. — P. 1041-1049.
10. Racusen L.C. // Clin. Invest. — 1993. — V. 71, N. 10. — P. 858-860.
11. Safirstein R., Winston J., Moel D. et al. // Int. J. Androl. — 1987. — V. 10. — P. 325-346.
12. Shah S.V., Walker P.D. // Amer. J. Physiol. — 1988. — V. 255, N. 3. — P. F438-F443.
13. Sharma R.P., Edwards I. R. // Biochem. Pharmacol. — 1983. — V. 32. — P. 2665-2669.
14. Siddik Z.H., Dible S.E., Boxall F.E., Harrap K.R. // Renal — Pharmacology and Toxicology of Cisplatin and Carboplatin in Animals / Eds McBrien D.C.H., Slater T.E. — Oxford, 1986. — P. 171-191.
15. Spector T. // Anal. Biochem. — 1978. — V. 86, N. 1. — P. 142-146.

A COMPARATIVE STUDY OF THE ACTION OF ANTITUMOUR PLATINUM DRUGS WITH DIFFERENT NEPHROTOXIC EFFECT

V.T.Bakhteeva, E.M.Fok, E.A.Lavrova

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Sankt-Petersburg

Studying the action of the two antitumour platinum compounds — cisplatin capable of exerting a nephrotoxic action and cycloplatin which has no damaging effect on the kidney, it was found that 3 h after the administration of cycloplatin the content of platinum in the kidney was 2 times lower than in the case of cisplatin. Due to different dynamics of the excretion of platinum compounds from the kidney 5 days after their addition the content of platinum in the kidney was the same in both cases. The content of platinum in the nuclei, mitochondria and supernatant with respect to a total content in the kidney cortex was almost equal for both compounds. Inhibition of nephrotoxic effect of cisplatin after the animals were pretreated with choline chloride or paraaminohippurate is not connected with a decrease of platinum in the kidney either 3 h, or 5 days after the injection of these preparations. The mechanisms of nephrotoxic action of cisplatin and its prevention are discussed.

Key words: platinum, nephrotoxicity, side effect, rat.