

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 615.015.2

Валеев В.В.<sup>1</sup>, Трашков А.П.<sup>1</sup>, Коваленко А.Л.<sup>2</sup>, Петров А.Ю.<sup>1</sup>, Васильев А.Г.<sup>1</sup>

## **Новый вазодилататор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доксорубин-индуцированной кардиотоксичности**

<sup>1</sup> — ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН», 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, д. 44

<sup>2</sup> — ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

**Цель исследования** — изучение кардиопротективного действия натрия-L-аргинина сукцината при поражении миокарда крыс доксорубином. **Методика.** Эффективность препарата оценивали по динамике морфометрических и биохимических изменений, отражающих интенсивность перекисного окисления и структурно-функциональное изменения в миокарде. **Результаты.** Показано, что использование натрия-L-аргинина сукцината для профилактики и лечения антрациклиновой кардиомиопатии снижает кардиотоксическое действие доксорубина, уменьшая масштаб деструкции кардиомиоцитов, степень дисфункции левого желудочка и выраженность гипертрофии миокарда.

**Ключевые слова:** аргинин; доксорубин; янтарная кислота; антрациклиновая кардиомиопатия; перекисное окисление.

**Для цитирования:** Валеев В.В., Трашков А.П., Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Васильев А.Г. Новый вазодилататор натрия-L-аргинина сукцинат в профилактике и лечении доксорубин-индуцированной кардиотоксичности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 52–57.

**Для корреспонденции:** Валеев Вадим Владиславович, науч. сотр. ИЭФБ РАН, e-mail: vadimvaleev81@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.08.2016

Valeev V.V.<sup>1</sup>, Trashkov A.P.<sup>1</sup>, Kovaleko A.L.<sup>2</sup>, Petrov A.U.<sup>1</sup>, Vasiliev A.G.<sup>1</sup>

## **Sodium-L-arginine succinate — a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity**

<sup>1</sup> — I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; 44, Pr. Morisa Toreza, St.Petersburg, Russia, 194223

<sup>2</sup> — Toxicology Institute of the Federal Medical and Biological Agency; 1, ul. Bekhtereva, St.Petersburg, Russia, 192019

**The purpose:** to ascertain possible cardioprotective effect of Sodium-L-arginine Succinate in case of myocardial lesions caused by Doxorubicin in rats. **Methods.** The effectiveness of the drug was assessed by morphometric and biochemical changes reflecting peroxidation intensity and structural and functional changes in myocardium. **Results.** Sodium-L-arginine Succinate used for the treatment and prophylaxis of antracyclic cardiomyopathy was demonstrated to decrease Doxorubicin effects lessening cardiomyocytal destruction and the left ventricular dysfunction with myocardial hypertrophy.

**Keywords:** arginine; Doxorubicin; succine acid; antracyclic cardiomyopathy; peroxidation.

**For citation:** Valeev V.V., Trashkov A.P., Kovaleko A.L., Petrov A.U., Vasiliev A.G. Sodium-l-arginine succinate — a new vasodilating medicine for the treatment and prophylaxis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimentalnaya terapiya. (Pathologocal Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60(4): 52–57. (in Russ).

**For correspondence:** Vadim V. Valeev, Researcher work I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences; 44, Pr. Morisa Toreza, St.Petersburg, 194223, Russian Federation, e-mail: vadimvaleev81@mail.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The study had no sponsorship.

Received 16.08.2016

## Введение

Доксорубин — противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, впервые получен специалистами итальянской фармацевтической компании Farmitalia Research Laboratories в середине XX века. Высокая эффективность доксорубина в отношении опухолей кроветворной системы, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и других новообразований подтверждена в ходе многочисленных экспериментальных и клинических исследований [1, 2]. Однако противоопухолевое действие доксорубина не является избирательным, и его применение существенно ограничивается токсическим воздействием на интактные ткани. Основным лимитирующим фактором при назначении доксорубина является кардиотоксичность препарата, которая может быть острой или хронической. Острая кардиотоксичность развивается во время приема доксорубина или в течение 3 сут. после его отмены и проявляется в виде миоперикардита с нарушениями сердечного ритма, реже — в форме острой левожелудочковой недостаточности. Хроническая кардиотоксичность, связанная с кумулятивным действием препарата и клинически проявляется спустя месяцы после лечения доксорубином в виде снижения систолической функции левого желудочка и развития хронической сердечной недостаточности [2—4].

Механизмы доксорубин-индуцированной кардиотоксичности в настоящее время изучены недостаточно, несмотря на более чем, полувековую историю применения в онкологической практике. Предполагается, что механизмы гибели кардиомиоцитов опосредованы избыточной активацией свободнорадикальных процессов и/или изменением цитокинового баланса и эндокринного статуса пациентов, вызванными терапией доксорубином [2, 5]. Экспериментальные исследования показали, что доксорубин снижает внутриклеточную концентрацию макроэргических соединений — аденозинтрифосфорной кислоты и фосфокреатинина в кардиомиоцитах [6—8]. Наряду с дисфункцией митохондрий причинами развития энергодифицитного состояния сердечной мышцы могут быть снижение утилизации кардиомиоцитами энергетических субстратов (глюкозы, жирных кислот) [9] и нарушение функции кретинофосфокиназы [10].

Доксорубин-индуцированная кардиотоксичность является одной из наиболее частых причин отмены препарата, увеличения длительности интервала времени до его последующего введения или снижения эффективной дозы. Это приводит к изменению схемы терапии и ухудшению прогноза лечения. В качестве средств фармакологической кардиопротекции широко используют арсенал антигипертензивных и кардиото-

нических препаратов (ингибиторы АПФ, бета-блокаторы), заимствованных из кардиологической практики [11, 12]. Однако их лекарственное взаимодействие с цитостатическими препаратами и эффективность применения изучены недостаточно.

*Цель исследования* — изучение кардиопротективного действия нового препарата натрия-L-аргинина сукцината («Унифузол®», ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия) при поражении миокарда крыс доксорубином.

## Методика

Исследование проводилось на 102 самцах альбиносах серых крыс (*Rattus, John Berkenhout, 1769*), массой тела 200—220 г, разведения ФГУП ПЛЖ «Раполово» РАМН (Ленинградская область). Подопытные крысы после поступления из питомника проходили 14-дневный карантин в карантинном блоке вивария с целью исключения из эксперимента животных с соматической и/или инфекционной патологией. После завершения периода карантина, предусматривался дополнительный (1 сут.) период адаптации животных к основному помещению вивария.

Содержание, питание и контроль состояния животных, все виды манипуляций и эвтаназию производили в соответствии с нормами биоэтики и законодательства Российской Федерации, регламентирующими работы с использованием лабораторных животных (ГОСТ 33044 — 2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (OECD Guide 1:1998, IDT); *European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg. 18.III.1986. European Treaty Series — № 123*) [13].

Рандомизацию животных осуществляли методом случайных чисел. Были выделены 3 экспериментальные группы:

1. «Контроль» (n = 12) — интактные животные без признаков инфекционной и/или соматической патологии для анализа нормальных значений исследуемых показателей.

2. «Доксорубин» (n = 45) — животные, которым интраперитонеально вводился доксорубин с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования: 3-и, 10-е и 28-е сут. после введения доксорубина.

3. «Унифузол» (n = 45) — животные, которым вводился доксорубин и далее в течение 10 сут. проводилось лечение препаратом «Унифузол» в объеме 2,5 мл внутривенно с последующим анализом определяемых показателей в контрольных точках исследования. Первое введение препарата производили через 45 мин после применения цитостатика.

С целью моделирования доксорубициновой интоксикации использовали препарат «Доксорубин Эбеве» (EBEWE Pharma Ges.mbH Nfg. KG, Австрия). Используемая доза препарата — 12,6 мг/кг массы тела животного, составляет LD<sub>50</sub> для крыс (инструкция по медицинскому применению препарата «Доксорубин Эбеве»). Взятие крови производили путём транскутанной пункции сердца животных в условиях общего обезболивания (инъекционный золетилловый наркоз, 0,7 мл/кг массы тела, внутривенно) в вакуумную систему Monovette (SARSTEDT, Германия) с антикоагулянтом (КЗ-ЭДТА) в объеме 6 мл.

Для анализа функционального состояния миокарда и степени выраженности кардиотоксического действия доксорубина определяли содержание в крови кардиоспецифических маркеров: креатининфосфокиназы-МВ (КФК-МВ) и предсердного натриуретического пептида (NT-proBNP). Состояние антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления оценивали по уровню каталазы крови, супероксиддисмутазы (СОД) и концентрации малонового диальдегида (МДА).

После окончания взятия крови с целью морфометрического исследования органа-мишени производили быстрое вскрытие грудной клетки животного и осторожное извлечение сердца и легких. Необходимые фрагменты иссекались и погружались в 10% нейтральный забуференный формалин на 48 ч. Обработку материала производили общепринятым способом и заливали в парафин. Срезы окрашивали и проводили изучение ткани сердца методом световой микроскопии. Оценивали: геометрию, массо-ростовой коэффициент, стромальный компонент и микроциркуляторное русло органа.

Статистическую обработку производили при помощи программы SPSS. Данные приведены в виде  $M \pm SE$  (средняя арифметическая  $\pm$  ошибка средней арифметической). Проверка характера распределения данных производилась путем расчета критерия Колмогорова—Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок осуществляли при помощи критерия Стьюдента (при нормальном характере распределения вариант в выборочной совокупности) и U-критерия Манна—Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Статистически значимыми различиями считали вероятность не менее 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Введение подопытным животным доксорубина приводило к развитию выраженных нарушений со стороны органов сердечно-сосудистой, гепатобилиарной, эндокринной и мочевыделительной систем.

Интегральным показателем, позволяющим оценить степень тяжести патологического процесса и, как следствие, уровень напряженности используемой модели, является уровень летальности крыс в обследуемых группах (табл. 1).

Результаты определения уровня летальности в экспериментальных группах подтверждают обоснованность выбора и напряженность использованной модели патогенеза доксорубициновой интоксикации. Полиорганная недостаточность, развившаяся вследствие введения доксорубина, приводила к гибели более 50% подопытных животных, не получавших до этого лечение исследуемым препаратом (LD<sub>58</sub>, табл. 1). Гибель животных в первые 3-е сут. (46%) была обусловлена острой интоксикацией (синдром полиорганной недостаточности), непосредственную причину

Таблица 1  
Влияние препарата «Унифузол» на летальность подопытных крыс с антрациклиновой кардиомиопатией

Группа	Период наблюдений	Летальность		
		Количество павших особей	Процент от исходного объема выборки в группе	95% ДИ
Контроль	Общая летальность	У контрольных животных летальность не регистрировалась		
Доксорубин	72 ч	12	46	26,6—66,6
	3—10-е сут.	4	15	4,4—34,9
	11—28-е сут.	10	39	20,2—59,4
	Общая летальность	26	58	42,2—72,3
Унифузол	72 ч	8	67	34,9—90,1
	3—10-е сут.	2	17	2,1—48,4
	11—28-е сут.	2*	17	2,1—48,4
	Общая летальность	12*	27	14,6—41,9

Примечание. \* — отличия с показателями группы "Доксорубин" статистически значимы ( $p < 0,05$ )

смерти установить не удалось ни у одной особи вследствие глубоких нарушений всех видов метаболизма, выраженной дисфункции системы кровообращения, интерстициального отека внутренних органов и развития системных отеков (асцит, плеврит). Гибель крыс в отсроченный период эксперимента (39%) была во всех случаях вызвана доксорубицин-индуцированной кардиомиопатией.

Применение Унифузола для лечения доксорубицин-индуцированной полиорганной недостаточности оказало выраженный терапевтический эффект, что выразилось в статистически значимом снижении показателя летальности крыс в 2,2 раза по сравнению с группой животных, не получавших фармакологической поддержки (27% и 58% соответственно). Профиль летальности, на фоне терапии Унифузолом, подвергся выраженной коррекции: удельный вес погибших животных был максимальным в первые 72 ч (период острой интоксикации — грубого сдвига гомеостатических параметров), гибель животных в отсроченный период эксперимента (с 11-х по 28-е сут.) от развившихся осложнений и, прежде всего, антрациклиновой кардиомиопатии, была минимальной (табл. 1).

Серьезные метаболические расстройства организма экспериментальных животных находили отражение в активации процессов перекисного окисления и выраженной депрессии активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Это отражалось в прогрессивном увеличении концентрации малонового диальдегида в крови крыс, сопровождающемся умеренным уменьшением активности основных антиоксидантных ферментов (табл. 2).

Применение Унифузола приводило к умеренной коррекции наблюдаемых нарушений комплекса биологического окисления в организме подопытных животных (табл. 2). На 10-е сут. на фоне терапии на-

блюдалось статистически значимое снижение содержания МДА в крови крыс в среднем на 31% ( $p < 0,05$ ) и одновременное увеличение активности СОД на 55%.

Нормализация работы кардиомиоцитов отразилась на динамике кардиоспецифических маркеров в крови подопытных животных (табл. 3).

Максимальный уровень КФК-МВ в обеих экспериментальных группах был зарегистрирован к 28-м сут. наблюдения: в группе «Доксорубицин» он в 10,8 раза превышал аналогичный показатель у интактных крыс. Проводимое лечение способствовало статистически значимому уменьшению уровня КФК-МВ — к окончанию эксперимента его содержание в крови крыс группы «Унифузол» было в 3 раза ниже, чем у нелеченных животных, однако, значение превышало контрольные значения (табл. 3).

Схожие различия наблюдались при оценке уровня NT-проBNP, характеризующего дисфункцию левого желудочка и степень сердечной недостаточности: к 28-м сут. эксперимента он повысился в группе «Доксорубицин» в 2 раза, в группе «Унифузол» только в 1,3 раза по сравнению с контрольным значением показателя (табл. 3). При этом наблюдались статистически значимые различия между группами «Доксорубицин» и «Унифузол».

Морфологическое исследование органа-мишени подтвердило наличие структурно-функциональных изменений миокарда у крыс с доксорубициновой интоксикацией, которые заключались в увеличении массо-ростового коэффициента без значимых изменений стромального компонента. Эти изменения были наиболее выражены в группе животных, не получивших фармакологическую поддержку Унифузолом. Обращает на себя внимание разнонаправленный характер изменений микроциркуляторного русла: в то время как в группе «Доксорубицин» ин-

Таблица 2

Влияние препарата «Унифузол» на состояние ферментов антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления у крыс с антрациклиновой кардиомиопатией ( $M \pm SE$ )

Группы	Период наблюдений	n	Исследуемые показатели		
			СОД, у.е./мл	Каталаза, у.е./мл	МДА, ммоль/л
Контроль	0-е сут.	12	7,3 ± 0,41	0,15 ± 0,05	12,1 ± 0,44
Доксорубицин	3-и сут.	7	2,3 ± 1,04*	0,16 ± 0,06	34,1 ± 4,52*
	10-е сут.	6	4,9 ± 2,15	0,23 ± 0,04	35,7 ± 5,52*
	28-е сут.	6	5,8 ± 1,62	0,24 ± 0,06	30,9 ± 2,91*
Унифузол	3-и сут.	10	3,6 ± 0,79*	0,22 ± 0,03	27,2 ± 3,62*
	10-е сут.	12	7,6 ± 0,52	0,22 ± 0,06	24,5 ± 2,91*. <sup>1</sup>
	28-е сут.	11	5,6 ± 0,76*	0,25 ± 0,05	28,0 ± 5,10*

Примечание. \* — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> — отличия с показателями группы «Доксорубицин» статистически значимы ( $p < 0,05$ )



Таблица 3

**Влияние препарата «Унифузол» на динамику содержания кардиоспецифических маркеров в крови подопытных крыс с антрациклиновой кардиомиопатией (M ± SE)**

Группы	Период наблюдений	n	Исследуемые показатели	
			КФК-МВ, нг/мл	NT-proBNP, нг/мл
Контроль	0-е сут.	12	4,4 ± 0,96	72,0 ± 7,08
Доксорубин	3-и сут.	7	17,7 ± 2,05*	92,0 ± 8,12*
	10-е сут.	6	21,3 ± 3,17*	108,1 ± 10,06*
	28-е сут.	6	47,4 ± 15,11*	145,7 ± 16,00*
Унифузол	3-и сут.	10	13,2 ± 5,15*	82,1 ± 7,52
	10-е сут.	12	6,5 ± 1,96 <sup>1</sup>	90,3 ± 6,51*
	28-е сут.	11	15,6 ± 3,31*. <sup>1</sup>	91,1 ± 8,08*. <sup>1</sup>

Примечание. \* — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы (p<0,05); <sup>1</sup> — отличия с показателями группы «Доксорубин» статистически значимы (p<0,05).

Таблица 4

**Влияние препарата «Унифузол» на массо-ростовой коэффициент, дистрофические изменения и состояние микроциркуляторного русла у крыс с антрациклиновой кардиомиопатией**

Группа	n	Массо-ростовой коэффициент (%)	Клеточно-стромальный коэффициент	Плотность микроциркуляторного русла
Контроль	12	0,44 ± 0,05	0,89	327,2 ± 12,34
Доксорубин, 3-и сут.	7	0,48 ± 0,08	0,92	198,8 ± 9,66*
Доксорубин, 10-е сут.	6	0,64 ± 0,10*	0,81	162,4 ± 11,42*
Доксорубин, 28-е сут.	6	0,85 ± 0,08*	0,66	180,5 ± 20,64*
Унифузол, 3-и сут.	10	0,44 ± 0,10	0,88	211,8 ± 37,89 *
Унифузол, 10-е сут.	12	0,52 ± 0,09	0,89	569,3 ± 44,00 *, <sup>1</sup>
Унифузол, 28-е сут.	11	0,61 ± 0,07*. <sup>1</sup>	0,75	682,1 ± 78,21 *, <sup>1</sup>

Примечание. \* — отличия с показателями группы «Контроль» статистически значимы; <sup>1</sup> — отличия с показателями группы «Доксорубин» статистически значимы

токсикация цитостатиком приводила к существенному снижению плотности микроциркуляторного русла, в группе крыс, получивших курс Унифузола, отмечался рост данного показателя в 2,1 раза по сравнению с контролем (p<0,05) к концу периода наблюдения (табл. 4).

**Выводы**

Полученные результаты исследования позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Применение раствора натрия-L-аргинина сукцината («Унифузол») ослабляет кардиотоксическое действие доксорубина, уменьшая масштаб деструкции кардиомиоцитов, степень дисфункции левого желудочка и выраженность гипертрофии миокарда.

2. Механизмы кардиопротективного действия Унифузола заключаются прежде всего в торможении процессов свободнорадикального окисления и выраженном ангиопротективном действии.

**References**

1. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009; 16: 3267-85.
2. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J.S. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010; 115(2): 155-62.
3. Takemura G., Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; 49: 330-52.
4. Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. A retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 2003; 97: 2869-79.
5. Vasyuk Yu.A., Shkolnik E.L., Nesvetov V.V. et al. Myocardial metabolic background on chemotherapy and means of their correction Consilium medicum. *Kardiosomatika.* 2013; 4(2): 11-5. (In Russian)
6. Jayaseelan R., Poizat C., Wu H.Y., Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5828-32.

7. Pelikan P.C., Weisfeldt M.L., Jacobus W.E. et al. Acute doxorubicin car-diototoxicity: functional, metabolic, and morphologic alterations in the isolated, perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986; 8: 1058-66.

8. Nicolay K., Aue W.P., Seelig J. et al. Effects of the anti-cancer drug ad-riamycin on the energy metabolism of rat heart as measured by in vivo <sup>31</sup>P-NMR and implications for adriamycin-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 929: 5-13.

9. Wakasugi S., Fischman A.J., Babich J.W. et al. Myocardial substrate utilization and left ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med.* 1993; 34: 1529-35.

10. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial

creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 516-23.

11. Vasyuk Yu.A., Shkolnik E.L., Nesvetov V.V. et al. Anthracycline cardiotoxicity: Prospects for using ivabradine. *Consilium Medicum. Kardiosomatika.* 2012; 3 (4): 65-9. (In Russian)

12. Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B. et al. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 393: 411-8.

13. Matjushin A.S., Osnjach V.S., Pavlova T.N. *Deontology of medical and biological experiments [Deontologija mediko-biologicheskogo jeksperimenta]*. Moscow; 1987. (In Russian)

#### Сведения об авторах:

Трашков Александр Петрович, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной фармакологии ИЭФБ РАН

Коваленко Алексей Леонидович, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. ФГБУН ИТ ФМБА

Петров Андрей Юрьевич, канд. фарм. наук, науч. сотр. ИЭФБ РАН

Васильев Андрей Глебович, доктор мед. наук, проф., науч. сотр. ИЭФБ РАН