

## Резкое повышение прооксидантного статуса тканей крыс при острой интоксикации циклофосфамидом

Л.Г. Тадевосян, Г.М. Симонян, М.А. Симонян, Г.А. Геворкян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА  
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

**Ключевые слова:** кровь, циклофосфамид, металлопротеины

Циклофосфамид (ЦФ) является цитостатиком, используемым при химиотерапии онкологических заболеваний различной этиологии подавления роста опухолевых клеток. Однако ЦФ вызывает деградирующий эффект на нормальных клетках, почечную недостаточность, нарушение работы легких, подавление продуцирования эритроцитов и лейкоцитов в костном мозге, снижает транспорт кислорода эритроцитами, нарушает функционирование нуклеиновых кислот, В- и Т-клеток, подавляет процесс продуцирования антител в сыворотке [6,9] и оказывает иммуносупрессорное воздействие [4]. С другой стороны, ЦФ нормализует экспрессию интерлейкина (ИЛ)-12, ИЛ-4, ИЛ-5 и снижает уровень интерферона у больных мультиплетным склерозом [5]. ЦФ вызывает апоптоз СОV434 гранулоцитов человека, который приводит к оксидативному стрессу и истощению глутатиона [11], подавляет активность тиоредоксин редуктазы в ткани мочевого пузыря [13]. В результате введения крысам 15 мг/кг ЦФ (посредством желудочного зонда 1 раз еженедельно, в течение 10 недель) наблюдается оксидативное повреждение спермы крыс, а при 35 мг/кг липоевой кислоты, введенной в аналогичном режиме, играет антистрессорную роль, регулируя уровень СОД, каталазы, глутатион пероксидазы и снижая степень поврежденности ДНК [7]. Мелатонин также оказывает протективный эффект, улучшая состояние ткани мочевого пузыря [10]. Вызванные ЦФ нарушения гомеостаза возвращаются к норме спустя некоторое время после окончания курса лечения.

Известно, что одним из механизмов действия иммунной системы является нейтрализация

антигенов продуцируемыми активными формами кислорода (АФК), которые образуются комбинированным ферментом НАДРН-оксидазой, состоящей из пяти изоформ цитохрома (цит)  $b_{558}$  и локализованной в мембране и цитозоле иммунных клеток [12]. С другой стороны, новые 5 изоформ цит  $b_{558}$  присутствуют в эритроцитарных мембранах (ЭМ) и сыворотке крови млекопитающих и рыб [2]. Причем цит  $b_{558}$  III ЭМ обладает активностью автономного продуцирования супероксидных радикалов ( $O_2^-$ ) и восстановления ферригемоглобина (ферриHb) [8].

Исходя из этого появляется необходимость определения  $O_2^-$ -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит  $b_{558}$  III, а также уровня и активности других ключевых металлопротеинов (МП) крови, печени и селезенки белых крыс при острой интоксикации ЦФ.

Целью работы явилось определение характерных изменений уровня и активности МП, регуляторов метаболизма АФК в тканях крыс под влиянием внутрибрюшинно введенного ЦФ.

### Материал и методы

Белые половозрелые крысы обоих полов (200-220г) были разделены на две группы (по 12 крыс). В опытной группе крысам вводили внутрибрюшинно по 40 мг/кг ЦФ (с 0,5 мл физраствором) ежедневно, в течение 6 дней. Группа контрольных животных получала физраствор в аналогичном режиме. Крыс декапитировали через 2 недели под легким эфирным наркозом. Кровь (по 20 мл) стабилизировали 2% оксалатом натрия. Печень (по 10 г) и селезенку (по 3 г) гомогенизировали в 0,04

М калий фосфатном буфере рН 7,4 (КФБ). Далее осуществляли одновременное получение МП из этих проб крови. МП антиоксидантной активности – МАА (Cu,Zn-СОД и каталаза из цитозоля эритроцитов, церулоплазмин и трансферрин – из сыворотки крови) и МП прооксидантной активности – МПА (2 новые изоформы цит  $b_{558}$  из ЭМ,  $O_2$ -продуцирующий липопротеин сыворотки-супрол), а также цит  $b_5$  из цитозоля эритроцитов получали аналитическим биотехнологическим способом, без использования детергента для солиubilизации ЭМ цит  $b_{558}$  [3], так как детергент существенно снижает стабильность этих гемопро-теинов. Для получения МАА и МПА белковые фракции сыворотки крови, ЭМ и цитозоля эритро-цитов после диализа против воды подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52, КМ-52 («Whatman», Англия) и на сефадексе DEAE А-50 («Pharmacia», Швеция) и гель-фильтрации на сефадексах G-75, G-150. МАА и МПА из печени и селезенки получали аналогичным образом, путем ионообменной хроматографии белковых фракций цитозоля и мембран клеток на целлюлозах DE-52, КМ-52.

Количество МП определяли оптическим спектральным методом, путем измерения плотности характерного максимального оптического поглощения для цит  $b_5$  при 525 нм, изоформ цит  $b_{558}$  – 530 нм, супрола – 430 нм, церулоплазмина – 610 нм и трансферрина – 470 нм, цитохрома С – 520 нм. Супероксиддисмугазную (СОД) активность и  $O_2$ -продуцирующую активность супрола и цит  $b_{558}$  III в гомогенной и гетерогенной фазе (в мембранах) определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, путем вычисления процента ингибирования (в случае СОД) или стимулирования образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности или продуцирующей активности принимали количество белка, которое соответственно подавляет или стимулирует обра-зование формазана на 50%.

Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающую активность цит  $b_{558}$  III определяли, используя свежеполученный метНб (ферриНб) крови крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) 0,8. При этом величина плотности максимального оптического поглощения бета-полосы цит  $b_{558}$  III в

реакционной смеси составляла 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствору метНб добавляли 0,2 мл цит  $b_{558}$  III (с  $A_{530} = 0,45$ ). После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 25-30°C. После повторного перемешивания смеси определяли кинетику восстановления ферриНб до ферроНб путем измерения снижения плотности альфа-поглощения ферриНб (это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроНб, который имеет поглощение при 565 нм). Для определения метНб-восстанавливающей активности цит  $b_{558}$  в гетерогенной фазе (в ЭМ) к ферриНб добавляли 0,2 мл ЭМ (мембраны клеток получали из 2 мл эритроцитов или из 1 г тканей и смешивали с 4 мл 0,04 М КФБ, рН 7,4).

Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода в присутствии и отсутствие ката-лазы. За единицу каталазной активности принимали то количество фракции (белка), которое расщепляет 0,1 М перекиси водорода в течение 1 мин при 20°C.

Оптические спектральные измерения осуществ-ляли на спектрофотометре «Spectord М-40» (Гер-мания) с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных резуль-татов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности Р.

### Результаты и обсуждение

Под влиянием ЦФ в приведенном режиме оксидативный стресс обусловлен характерным изменением уровня и активности МАА и МПА крови и тканей (селезенка и печень). Резкое уве-личение уровня цит  $b_5$  в цитозоле эритроцитов скорее всего обусловлено существенной потерей подвижности животных в опытной группе (табл. 1), такой эффект наблюдается на начальных этапах гипокинезии [1]. Существенное увеличение уровня сывороточных цит  $b_{558}$  I и цит  $b_{558}$  II обусловлено действием адаптационных систем крови против перекиси водорода (эти гемопро-теины обладают некоторой каталазамиметической актив-ностью). Снижение уровня суммарной фракции цит  $b_{558}$  ЭМ, видимо, обусловлено увеличением степени агрегации этих гемопро-теинов, осложняю-

Относительное изменение (%) уровня и активности МП крови, печени и селезенки после острой интоксикации крыс под влиянием внутривенно введенного циклофосфида, по сравнению со 100% контрольными показателями ( $P < 0,05$ ,  $n = 3$ )

Уровень и активность МП	%
Цитохром $b_5$	+148,7±25,1 ( $P < 0,03$ )
Сумма цитохромов $b_{558}I$ и $b_{558}II$	+ 78,6±6,4
Цитохром $b_{558}III$	- 30,8 ±3,9
Фракция цитохрома $b_{558}MKS$	+ 38,6 ± 3,4
$O_2^-$ -продуцирующая активность цит $b_{558}III$ из ЭМ (гомогенная фаза)	+ 43,0 ± 4,1
$O_2^-$ -продуцирующая активность цит $b_{558}$ в ЭМ (гетерогенная фаза)	- 14,1 ± 2,0
$O_2^-$ -продуцирующая активность фракции цит $b_{558}$ из MKC (гомогенная фаза)	- 83,3 ±6,7 ( $P < 0,03$ )
МетНб-восстанавливающая активность цит $b_{558}III$ из ЭМ (гомогенная фаза)	-55,4 ± 6,0
МетНб-восстанавливающая активность фракции цит $b_{558}$ из MKC (гомогенная фаза)	- 51,2 ± 4,3 ( $P < 0,03$ )
Супрол	+ 66,7 ± 3,9
$O_2^-$ -продуцирующая активность супрола	нет изменений
Цитохром С из печени	+ 54,5 ± 5,1
Цитохром С из селезенки	- 47,1 ±3,4
Церулоплазмин	- 50,0 ± 6,2 $P < 0,03$ )
Трансферрин	-7,4±1,1
Фракция СОД из цитоплазмы эритроцитов	нет изменений
Суммарная фракция Cu,Zn- и Мп-СОД из селезенки	нет изменений
Суммарная фракция Cu,Zn- и Мп-СОД из печени	нет изменений
Фракция каталазы из эритроцитов	нет изменений
Фракция каталазы из селезенки	нет изменений
Фракция каталазы из печени	- 41,7±3,3

щей процесс их отщепления. Из этих соображений можно предположить, что степень агрегации цит  $b_{558}$  в мембранах клеток селезенки (MKC) снижена (из-за чего повышается уровень отщепленного из гетерогенной фазы в гомогенную фазу фракции цит  $b_{558}$ ). Фактор агрегации этих гемопротеинов в гетерогенной фазе (или снижение текучести ЭМ) действует и на НАДРН-зависимую  $O_2^-$ -проду-

цирующую активность цит  $b_{558}III$ , которая снижена в ЭМ, но увеличена в гомогенной фазе. Однако  $O_2^-$ -продуцирующая активность цит  $b_{558}$  из MKC существенно снижена (табл.1). На этом фоне метНб-восстанавливающая активность цит  $b_{558}$  из ЭМ и фракция цит  $b_{558}$  из MKC заметно снижены. Снижение НАДРН-зависимой,  $O_2^-$ -продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности цит  $b_{558}$

ЭМ и особенно фракции цит  $b_{558}$  МКС (селезенка является органом иммунной системы) свидетельствует о том, что ЦФ подавляет иммунную систему и кислородный гомеостаз (метНв не способен перенести молекулярный кислород к клеткам). С другой стороны, заметное снижение уровня НАДРН-содержащего  $O_2$ -продуцирующего липопротеина сыворотки супрола (его  $O_2$ -продуцирующая активность не изменяется) считается положительным фактором, так как при этом сохраняется вязкость сыворотки и в целом микроцирку-

ляция крови. Под влиянием ЦФ заметно снижается уровень сывороточного церулоплазмينا (уровень трансферрина снижен в небольших количествах). При этом уровень отщепленного цит С из митохондрий печени существенно увеличен, тогда как этот процесс в селезенке подавлен. Активность  $Cu, Zn$ -СОД в цитозоле эритроцитов и суммарная  $Cu, Zn$ -СОД и Мп-СОД активность цитозоля печени и селезенки не изменяются, однако, активность каталазы в печени существенно снижена под влиянием ЦФ.

Таблица 2

Относительное изменение (%) антиоксидантного статуса (АС) и прооксидантного статуса (ПС) компонентов крови при острой интоксикации крыс циклофосфамидом

Биообъекты	АС	ПС
Сыворотка	-57,4	+145,3
Эритроциты	нет изменений	+117,8
Печень	-41,7	+54,5
Селезенка	нет изменений	-47,1

Суммарный уровень приведенных МАА и МПА (включая и цит С) или антиоксидантного статуса (АС) и прооксидантного статуса (ПС) подвергается характерным изменениям при острой интоксикации крыс ЦФ (табл. 2). По сравнению с АС, ПС повышен больше в сыворотке, далее в эритроцитах, печени и, наконец, в клетках селезенки. В этой последовательности оксидативному повреждению подвергаются больше всего сыворотка крови, далее эритроциты и печень и меньше всего селезенка. Такое стрессорное

состояние животных отражается и на степени выживаемости животных, что составляет всего 65-70%.

Предполагается, что при острой интоксикации крыс ЦФ механизмы иммуносупрессорного и отрицательного эффектов этого препарата на кислородный гомеостаз обусловлены снижением НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНв-восстанавливающей активности цитохрома  $b_{558}$  из эритроцитарных мембран и мембран клеток селезенки.

Поступила 03.12.07

### Առնետի հյուսվածքների պրոօքսիդանտային կարգավիճակի կտրուկ ան ցիկլոֆոսֆամիդով սուր բուժավորման ժամանակ

Լ.Հ.Թադևոսյան, Գ.Մ.Միննյան, Մ.Ա.Միննյան, Գ.Ա. Գևորգյան

Սպիտակ առնետներին 6 օր տևողությամբ ներորոպայնային ներարկվել է 40 մգ/կգ ցիկլոֆոսֆամիդ (ՑՖ): Ուսումնասիրությունները կատարվել են փորձի 15-րդ օրը. ՑՖ-ով հա-

րուցված սուր բուժավորման պայմաններում դիտվում է պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների գումարային մակարդակի (պրոօքսիդանտային կարգա-

վիճակ) կորուկ աճ հակաօքսիդանտային կարգավիճակի համեմատ՝ արյան շիճուկում, էրիթրոցիտներում և ապա լյարդում և փայծաղում: Այս փոփոխությունները հարուցում են հյուսվածքների օքսիդատիվ վնասում՝ թթվածնի ակտիվ միացություններով և որպես հետևանք մեծանում է մահացած կենդանիների թիվը (30-35%):

Ենթադրվում է, որ ցիկլոֆոսֆամիդի իմունաարգելակիչ և թթվածնային հոմեոստազը թուլացնող ազդեցությունները պայմանավորված են էրիթրոցիտների և փայծաղի բջիջների թաղանթներից ստացված ցիտոքրոմ  $b_{558}$ -երի NADPH կախյալ սուպերօքսիդի գոյացման և մետհեմոգլոբինի վերականգնման ակտիվությունների համապատասխան անկմամբ:

### The acute rise in prooxidative status of the rat tissues at acute intoxication by cyclophosphamide

L.H.Tadevosyan, G.M.Simonyan, M.A.Simonyan, G.A.Kevorkian

In result of acute intoxication by intraperitoneally injected (40mg/kg body weight) cyclophosphamide to the white rats every day during 6 days (the tissues: blood, liver and spleen collected on the 15-th day of the experiment) an acute rise in the total level of prooxidative activity metalloproteins (prooxidative status) of the blood serum, erythrocytes, liver and spleen, in comparison with antioxidative status takes place. These changes lead to the corresponding oxidative dam-

age of these tissues by reactive oxygen species, as a result a decrease in the animals' survival rate (to 30-35%) is observed.

The immunosuppressing and the oxygen homeostasis depletion effects of cyclophosphamide are supposed to be conditioned by the decrease in the NADPH depending superoxide producing and methemoglobin-reducing activities of cytochromes  $b_{558}$  from erythrocytes and spleen cell membranes.

### Литература

1. *Акопян В.П., Симонян М.А., Манукян А.А., Симонян Р.М., Акопян А.А.* Дисбаланс между уровнями металлопротеинов крови в ранние сроки гипокинезии у крыс. Бюл.эксп.биол.мед., 2001, 11, с. 527-529.
2. *Симонян М.А., Бабалян М.А., Симонян Г.М.* Цитохромы  $b_{558}$  из сыворотки крови и мембран эритроцитов. Выделение, очистка и краткие характеристики. Биохимия, 1995, т.60(12), с. 1877-1987.
3. *Симонян М.А., Симонян Г.М.* Способ получения цитохромов  $b$  из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. N908 Армпатента. Ереван, 2001.
4. *Colvin O.M.* An overview of cyclophosphamide development and clinical applications, *Curr.Pharm.Des.*, 1999, 5(8), p.555-560.
5. *Comabella M, Balashov K, Issazadeh Sh. et al.* Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlated with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy, *J.Clin.Invest.*, 1998, 102, p.671-678.
6. *Schellekens P.T., Ten Berge R.J.* The effects of immunosuppressive drugs on human immunocompetence, *Pharm. Weekbl.Sci.*, 1984, 6(1), p.32-38.
7. *Selvakumar E., Prahalathan C., Sudharsan P.T., Varalakshimi P.* Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm, *Toxicology*, 2006, 17(1), 71-78.
8. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* The reduction of ferrihemoglobin by erythrocytes membranes cytochrome  $b_{558}$  III at various pathological states in vitro, *NAS RA Electronic J.of Natural Sciences*, 2006, 2(7), p.3-6.
9. *Ten Berge R.J., Schellekens P.T.* Immunosuppressive drugs in clinical medicine, *Neth. J. Med.*, 1994, 45(6), p.329-338
10. *Topal T., Oztas Y., Korkmaz A. et al.* Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats, *J.Pineal.Res.*, 2005, 38(4), 272-277.
11. *Tsai-Turton M., Luong B.T., Tan Y., Luderer U.* Cyclophosphamide - induced apoptosis on COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion, *Toxicol.Sci.*, 2007, 98(1), p.216-230.
12. *Vignais P.V.* The superoxide generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *Cell Mol.Biol. Sci.*, 2002, 59(9), p.1428-1459.
13. *Zhang J., Ma K., Wang H.* Cyclophosphamide suppresses thioredoxin reductase in bladder tissue and its adaptive response via inductions of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase, *Chem.Biol.Interact.*, 2006, 162(1), p.24-30.