

Теоретическая и практическая медицина

УДК 577.112 . 591.11

**Влияние циклофосфамида на активность
антиоксидантных и прооксидантных
металлопротеинов тканей крыс *ex vivo*****Л.Г. Тадевосян, Р.М. Симонян, М.А. Симонян,
Г.А. Геворкян***Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1**Ключевые слова:* гомогенат, циклофосфамид, металлопротеины

Циклофосфамид (ЦФ) является цитостатиком и широко используется в медицине. Однако ЦФ оказывает определенные отрицательные эффекты: усиливает апоптоз клеток костного мозга и периферических лимфоцитарных клеток, вызывает повреждение ДНК и, в целом, оксидативный стресс клеток различных тканей млекопитающих, почечную и сердечную недостаточность, подавляет продуцирование клеток крови костным мозгом, вызывая лейкопению и анемию [6,13,14,16,17,18]. С одной стороны, введенный в организм ЦФ оказывает иммуотропический эффект и иммунодефицит [11,12], повышает уровень норадреналина в клетках селезенки у BALB/с мышей [10]. Механизмы оксидативного повреждения клеток тканей крыс внутрибрюшинно введенным ЦФ *in vivo* ассоциированы с резким повышением прооксидантного статуса тканей крыс (кровь, печень, селезенка). С другой стороны, механизмы иммуносупрессорного подавления кислородного гомеостаза циклофосфамидом обусловлены снижением NADPH-зависимой супероксид (O_2^-)-продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активности изоформ цитохрома (цит) b_{558} из эритроцитарных мембран (ЭМ) и мембран клеток (МК) печени и селезенки соответственно [6].

Если механизмы оксидативного повреждения ЦФ на организм несколько выявлены *in vivo*, то на тканевом уровне *ex vivo* эти механизмы еще не определены. Решение этой задачи облегчит и расширит определение характера факторов непосредственного воздействия ЦФ на клеточном уровне.

Целью работы являлось комплексное определение характерных изменений уровня металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО) и металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) тканей

крыс (кровь, селезенка, костный мозг, сердце, печень и мозг) после непосредственного инкубирования гомогенатов этих тканей с ЦФ в аэробных условиях *ex vivo*.

Материал и методы

Циклофосфамид вводили в дозе 40 мг на 100 г массы белых беспородных крыс линии Вистар. Гомогенизацию тканей крыс (0,8 г костного мозга, 20 г головного мозга, 20 г сердца, 10 г селезенки, 30 г печени и 20 г почки) осуществляли в 0,04 М калий фосфатном буфере, рН 7,4 (1:10 об/мин), с угловой скоростью вращения ножей гомогенизатора 1000 об/мин, в течение 2 мин при 4°. К половине объема гомогенатов и крови (15 мл) – опытные пробы тканей (ОП), добавляли 10 мг/мл ЦФ, к контрольным пробам (К) ЦФ не добавляли. К и ОП тканей (включая кровь) инкубировали при 4° в течение 48 ч в аэробных условиях *ex vivo*. Далее осуществляли одновременное и комплексное получение МАА и МПА из ОП и К проб тканей.

МАА (Cu,Zn-СОД и каталаза – из цитоплазмы эритроцитов, Cu,Zn-СОД + Mn-СОД и каталаза – из цитоплазмы клеток тканей, церулоплазмин и трансферрин – из сыворотки крови) и МПА (суммарная фракция изоформ цит b_{558} из сыворотки крови, эритроцитарных мембран и мембран клеток тканей, O_2^- -продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол) получали универсальным биотехнологическим способом без применения детергента для солюбилизации суммарных фракций цит b_{558} ЭМ и МК тканей. Цитохром С получали из растворимой фракции гомогенатов тканей. МАА и МПА получали из тканей, после диализа против воды и центрифугирования белковых фракций сыворотки крови, цитоплазмы эритроцитов, белковых фракций МК и ЭМ, с дальнейшим их ионообменным хроматографированием на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 и суфадексе ДЕАЕ А-50 [3,4].

Количество МАА и МПА определяли оптическим спектральным методом, путем измерения плотности максимального оптического поглощения для изоформ цит b_{558} при 530 нм (бета полоса поглощения), супрола – 430, церулоплазмина – 610, трансферрина – 470, цитохрома (цит) С – 520 нм. СОД активность фракций и O_2^- -продуцирующую активность супрола и суммарной фракции изоформ цит b_{558} в гомогенной фазе определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем вычисления процента ингибирования (для СОД) или стимулирования образования формазана при 560 нм (для супрола или цит b_{558}), в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности или O_2^- -продуцирующей активности принимали количество белка, которое подавляет или стимулирует образование формазана на 50%.

Метгемоглобин (метНб)-восстанавливающую активность изоформ

цит b_{558} определяли используя ферри Нб цитоплазмы эритроцитов крыс с величиной плотности оптического поглощения (при 565 нм) 0,8. При этом величина плотности бета-поглощения изоформ цит b_{558} в реакционной смеси составляла 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствору ферри Нб добавляли 0,2 мл суммарной фракции цит b_{558} с $A_{530} = 0,4$. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 30°. Далее, после повторного перемешивания реакционной смеси, определяли кинетику восстановления ферри Нб до ферро Нб путем измерения снижения плотности альфа-полосы поглощения ферри Нб (это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферро Нб, который имеет максимальное поглощение при 555 нм). Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием раствора перекиси водорода в присутствии и отсутствии каталазы. За единицу каталазной активности принимали количество фракции, которое расщепляет 0,1 М перекись водорода в течение 1 мин при 20°.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре "Specord UV-VIS" с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли известным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности P .

Результаты и обсуждение

Инкубирование ЦФ с гомогенатами тканей и с кровью вызывает неадекватные изменения суммарного уровня МПА – изоформ цит b_{558} , полученных из МК этих тканей. На фоне увеличения уровня суммарной фракции цит b_{558} МК эритроцитов, печени и мозга, в костном мозгу и в сыворотке крови уровень этих гемопротеинов практически не изменяется (табл.1) и заметно снижается в МК селезенки, сердца и почек. При этом наблюдается снижение уровня другого МПА – супрола в сыворотке крови. Эти данные свидетельствуют о том, что при аэробном инкубировании ЦФ с гомогенатами тканей, последние оказывают неадекватную резистентность против ЦФ. Уровень же другого МПА – цит С в тканях в подавляющем большинстве снижается под влиянием ЦФ *ex vivo*, только в почечной ткани наблюдается повышение уровня этого гемопротеина.

В приведенных условиях ЦФ вызывает повышение O_2^- -продуцирующей активности суммарной фракции цит b_{558} из МК печени, мозга, селезенки и почек, но почти не изменяет эту активность у суммарной фракции цит b_{558} из МК костного мозга и сердца (табл. 1). Фактически под влиянием ЦФ не всегда снижение уровня изоформ цит b_{558} в МК тканей ассоциируется с адекватным снижением NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этих гемопротеинов *ex vivo*.

Таблица 1

Относительные изменения (%) уровня NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности суммарной фракции изоформ цит b_{558} из ЭМ и МК тканей после 48 ч инкубирования крови и гомогенатов тканей крыс с 10 мг/мл циклофосфамидом *ex vivo*, по сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие ЦФ), $P < 0,05$, $n=4$

Суммарная фракция изоформ цит b_{558} из сыворотки крови, ЭМ и МК тканей	Уровень	NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность	МетНб-восстанавливающая активность
Сыворотка	+ 4,7 ± 0,3	- 23,4 ± 2,5 ($P < 0,001$)	- 34,6 ± 5,9
ЭМ	+ 57,3 ± 6,1 ($P < 0,01$)	- 44,3 ± 5,1	- 60,5 ± 7,5 ($P < 0,03$)
Селезенка	- 52,1 ± 4,7	- 56,9 ± 5,7 ($P < 0,03$)	- 44,6 ± 7,7
Костный мозг	- 5,1 ± 0,2	- 7,1 ± 0,6	- 3,7 ± 0,4
Мозг	+ 42,6 ± 4,1 ($P < 0,001$)	+ 65,4 ± 7,1 ($P < 0,01$)	+ 15,1 ± 2,2
Печень	+ 22,3 ± 2,4	+ 77,2 ± 6,5	+ 28,3 ± 5,1 ($P < 0,01$)
Почки	- 37,5 ± 4,7 ($P < 0,03$)	+ 51,1 ± 4,7 ($P < 0,001$)	- 11,3 ± 1,4
Сердце	+ 24,1 ± 3,3	+ 4,6 ± 0,2	+ 29,2 ± 4,3 ($P < 0,001$)
Супрол из сыворотки	- 35,0 ± 4,8	+ 15,1 ± 2,4	-

МетНб-восстанавливающая активность суммарной фракции изоформ цит b_{558} ЭМ и МК других тканей также изменяется неадекватным образом. Повышение этой активности у изоформ цит b_{558} из МК печени, сердца и мозга сопровождается снижением этой активности у изоформ цит b_{558} из селезенки, ЭМ, мозга и почек (табл. 1).

Переходя от МПА к МАА, можно констатировать, что под воздействием ЦФ *ex vivo* активность ключевых МАА (Cu,Zn-СОД, Мп-СОД, каталазы и церулоплазмина) в приведенных биосистемах имеет тенденцию к снижению (только уровень трансферрина повышается), как это показано в табл. 2.

Каковы возможные молекулярно биохимические механизмы непосредственного воздействия ЦФ на гомогенаты тканей и, соответственно, на локализованные в них МАА и МПА *ex vivo*?

Известно, что цитотоксический эффект и эффект оксидативного повреждения ЦФ *in vivo* в основном связывается с повышением уровня

Таблица 2

Относительные изменения (%) уровня МАА из эритроцитов, сыворотки и цитозоля тканей, а также цит С из цитозоля тканей после 48 ч инкубирования крови и гомогенатов тканей крыс с 10 мг/мл циклофосфамидом *ex vivo*, по сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие ЦФ), $P < 0,05$, $n = 4$

Сu,Zn-СОД+ Мп-СОД из тканей:	Активность МАА	Уровень цит С
селезенки	-26,3 ± 4,1 ($P < 0,001$)	- 44,6 ± 5,2
печени	- 18,1 ± 2,2	+ 28,3 ± 5,1 ($P < 0,01$)
сердца	-23,8 ± 2,7	+ 29,2 ± 4,3
почек	- 25,6 ± 2,8 ($P < 0,01$)	-11,3 ± 1,4 ($P < 0,03$)
костного мозга	-23,9 ± 4,1	-
головного мозга	-13,1 ± 1,5	+ 15,7 ± 2,2
Сu, Zn-СОД из цитоплазмы эритроцитов	-17,5 ± 3,1 ($P < 0,03$)	-
Каталаза из тканей:	-25,0 ± 4,3	-
печени		
селезенки	-33,4 ± 2,6 ($P < 0,03$)	-
сердца	-20,7 ± 2,1	-
почек	- 11,2 ± 1,1	-
костного мозга	- 22,5 ± 2,0 ($P < 0,001$)	-
головного мозга	-18,2 ± 2,1 ($P < 0,01$)	-
из цитоплазмы эритроцитов	-15,9 ± 1,5	-
Церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови	- 46,3 ± 8,3 (для ЦП), + 51,2 ± 4,8 (для ТФ), ($P < 0,001$)	-

перекиси водорода [7,17], в первую очередь с продуктом ее расщепления – гидроксильным радикалом ($\text{HO}^\bullet$), при накоплении которых они вызывают денатурирование (инактивирование) изоформ цит b_{558} , а также МАА (Сu,Zn-СОД, церулоплазмин, каталаза) и ДНК, но практически не влияют на трансферрин и Мп-СОД [1, 2, 15].

Можно констатировать, что под влиянием ЦФ *ex vivo* также (как и *in vivo*) происходит накопление перекиси водорода (гидроксильных радикалов) в гомогенатах тканей в различной степени (это, в первую очередь, зависит от величины каталазной активности в тканях), соответственно, наблюдаются и различного диапазона изменения уровня и активности МАА и МПА, регуляторов метаболизма активных форм кислорода, иммунного ответа, кислородного гомеостаза и генетического кода.

Поступила 06.03.09

**Ցիկլոֆոսֆամիդի ազդեցության մեխանիզմները առնետների
հյուսվածքների հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային
ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների մակարդակների և
ակտիվությունների վրա *ex vivo***

**Լ.Գ.Թադևոսյան, Ռ.Մ.Սիմոնյան, Մ.Ա.Սիմոնյան,
Գ.Ա.Գևորգյան**

Ցիկլոֆոսֆամիդի (ՑՖ) թունավոր ազդեցության մեխանիզմները քթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող կարևոր մետաղապրոտեինների (ՄՊ) վրա *in vivo* պայմանավորված են առնետների հյուսվածքների պրոօքսիդանտային կարգավիճակի կտրուկ աճով: Այս հետազոտության նպատակն է որոշել ՑՖ-ի ազդեցության մոլեկուլային կենսաքիմիական մեխանիզմները՝ ՑՖ-ի հետ հյուսվածքների հոմոգենատների ինկուբացումից հետո *ex vivo*. Աերոք պայմաններում 4⁰-ում 48 ժամ 10 մգ/մլ ՑՖ-ի և հյուսվածքների (ուղեղ, փայծաղ, ոսկրածուծ, լյարդ, երիկամ, սիրտ) հոմոգենատների ինկուբացման հետևանքով *ex vivo* դիտվում է պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված ՄՊ (ցիտոքրոմ C, հյուսվածքների բջջաթաղանթներից ստացված ցիտոքրոմ b_{558} -ի իզոմերի գումարային ֆրակցիա և O_2^- գոյացնող շիճուկային լիպոպրոտեին՝ սուպրոլ), ինչպես նաև ցիտոքրոմ b_{558} -ի գումարային ֆրակցիաների NADPH կախյալ O_2^- գոյացման և մեթիլմոզոնի վերականգնման ակտիվությունների՝ ՑՖ-ի ներկայության և բացակայության պայմաններում ոչ նմանատիպ փոփոխություններ: Վերջիններս համակցվում են հիմնական՝ հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված ՄՊ (Cu , Zn -ՍՕՂ, Mn -ՍՕՂ, կատալազ, ցերուլոպլազմին և տրանսֆերին) մակարդակների և ակտիվությունների ոչ համաչափ շեղումների (հիմնականում նվազման) հետ նույնպես:

Ենթադրվում է, որ այսպիսի պայմաններում ՑՖ խթանում է հյուսվածքների հոմոգենատներում ջրածնի պերօքսիդի տարբեր քանակներով գոյացման գործընթացը (ջրածնի պերօքսիդի ճեղքման վերջանյութը հիդրօքսիլ ռադիկալն է, որը անդարձելիորեն դեմատուրացնում է վերոհիշյալ ՄՊ-երը), առաջ բերելով դրանց մակարդակների և ակտիվությունների ոչ նմանատիպ փոփոխություններ *ex vivo*:

The influence of cyclophosphamide on the levels and activities of tissues' antioxidative and prooxidative metalloproteins *ex vivo*

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

The mechanisms of the toxic influence of cyclophosphamide (CPH) on the state of the key metalloproteins (MP), the regulators of reactive oxygen species

metabolism *in vivo* are connected with the sharp increase of the pro-oxidative status of the rat tissues.

The aim of this investigation was to determine the molecular and biochemical mechanisms of the influence of CPH on these MP, after incubation of tissues' homogenates with CPH *ex vivo*. After aerobic incubation of the blood and tissues' homogenates (brain, spleen, bone marrow, liver, kidney, heart) during 48 h at 4° with 10 mg/ml CPH, the nonequivalent changes of the levels of pro-oxidative activity metalloproteins (cytochrome C, total fraction of the cytochrome b_{558} isoforms from cell membranes), O_2^- -producing lipoprotein of the serum – suprol), as well as NADPH-dependent O_2^- -producing and methemoglobin-reducing activities of these total fractions of cytochrome b_{558} isoforms from tissue homogenates in the presence and absence of CPH were observed. These changes were associated with the nonequivalent shifts in the level and activity (on the whole they are decreased) of the key metalloproteins of the antioxidative activity (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, catalase, ceruloplasmin and transferrin).

It is supposed that in these conditions, CPH stimulates the process of the H_2O_2 generation with various degree in the tissue homogenates (the product of H_2O_2 decay is hydroxide radical, which irreversibly denaturized these MP), and nonequivalent changes of the levels and activities of these MP take place *ex vivo*.

Литература

1. Мжелская Т.И. Биологическая функция церулоплазмينا. Бюл.эксп.биол.мед., 2000, 130(8), с.124-132.
2. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Симосян М.А. Высокая резистентность сывороточных цитохромов b_{558} против перекиси водорода по сравнению с другими гемопротеинами. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины, ЕРГМУ им.М. Гераци, Ереван, 1999, с. 48-51.
3. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. N908 Армпатента, Ереван, 1997.
4. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N 908 Армпатента, Ереван, 2001.
5. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Симосян М.А., Бабалян М.А. Х-облучение эритроцитарных мембран и цитохрома b_{558} III *in vitro* стимулирует агрегацию последнего и снижает его O_2^- -продуцирующую и метгемоглобин-восстанавливающую активность. Мед.наука Армении НАН РА, 2004, т. XLIV, 1, с.43-46.
6. Тадевосян Л.Г., Симосян Г.М., Симосян М.А., Геворкян Г.А. Резкое повышение прооксидантного статуса тканей крыс при острой интоксикации циклофосфамидом. Мед.наука Армении НАН РА, 2007, XLVII, 4, с.34-38.
7. Abraham P., Sugumar E. Enhanced PON 1 activity in the kidneys of cyclophosphamide treated rats may play a protective role as an antioxidant against cyclophosphamide induced oxidative stress. Arch.Toxicol., 2007.
8. Escobar J.A., Rubio M.A., Lissi E.A. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxyl radicals. Free Radic.Biol.Med., 1996, 20(3), p. 285-290.
9. Fridovich I. Superoxide radical and SODs. Ann. Rev.Biochem., 1995, 64, p. 97-112.
10. Kapr J.D., Szczytkowski J.L. Cyclophosphamide induces dose- and time dependent elevation in spleen norepinephrine levels of BALB/c mice. Neurosci.Lett., 2003, 344(2), p. 117-121.

11. *Kondratyeva T.K., Fontalin L.N., Mikheeva N.V.* T-cell cell immunodeficiency induced by T-cell mitogens combined with cyclophosphamide injection. *Immunol.Lett.*, 1992, 34(1), p.71-77.
12. *Leonteva T.I., Gladkova N.E., Uteshev B.S.* Immunotropic activity of cyclophosphane. *Farmacol.Toxocol.*, 1988, 51(6), p. 60-65.
13. *Polapovich M.V., Eremin A.N., Metelitsa D.I.* Kinetics of catalase inactivation, induced by ultrasonic cavitation. *Prokl.Biochim.Microbiol.*, 2003, 39(2), p. 161-165.
14. *Selvakumar E., Prehalathan C., Mythily Y., Varalakshmi P.* Benifical effects of DL-alpha-lipoic acid on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mitochondrial fractions of rat testis. *Chem.Biol.Interact.*, 2005, 152(1), p. 59-66.
15. *Sugiura Y., Suzuki T., Kuwahara J., Tanaka H.* On the mechanism of H₂O₂, O₂- and ultraviolet light induced DNA cleavages of inactive bleomycin-iron (III) complex. *Biochem.Biophys.Res.Communs.*, 1982, 105(4), p.1511-1520.
16. *Tsai-turton M., Luong B.T., Tan Y., Luderer U.* Cyclophosphamide induced apoptosis in COV434 human granulose cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol.Sci.*, 2007, 98(1), p.216-230.
17. *Zhang G.H., Wu C.F., Duan L., Yang J.Y.* Protective effect of total saponins from stem and leaf of Panaxginseng against cytophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. *Food Chem. Toxicol.*, 2007.
18. *Zhang G.H., Wu C.F., Duan L., Yang I.Y.* Protective effect of ginsenoside Rg(3) against cyclophosphamide induced DNA damage and cell apoptosis in mice. *Arch.Toxicol.*, 2007.