

Теоретическая и профилактическая медицина

УДК 577.112 . 591.11

Различия в толерантности металлопротеинов анти- и прооксидантной активности крови крыс после аэробного инкубирования крови с циклофосфамидом**Л.Г. Тадевосян, Г.М. Симонян, М.А. Симонян,
Л.Н. Аракелян, Р. Л. Айрапетян, Г.А. Геворкян***Институт биохимии им.Г.Х.Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: циклофосфамид, металлопротеины, ткань, крысы (самки, самцы)

Патофизиологические механизмы действия циклофосфамида (ЦФ) в основном обусловлены продуцированием активных форм кислорода (АФК), которые вызывают геморрагический цистит, нарушение функционирования клеток легких млекопитающих, вызывая воспалительные процессы и оксидативное повреждение, на фоне подавления активности антиоксидантных защитных систем, и повреждения микроструктуры ДНК [11,12,14,18,19], а препараты с антиоксидантной активностью (витамин С, DL-альфа-липоевая кислота, амифостин, мелатонин [10,14,20]) оказывают протективный эффект. ЦФ индуцирует апоптоз СОV434 гранулоцитов крови [21]. Действуя такими механизмами, ЦФ в определенных концентрациях вызывает повреждение опухолевых клеток при бронхиальной карциноме и раке легких [9], с определенным повышением эффективности адаптивной иммунотерапии у мышей [13]. Однако имеются и противоположные данные о том, что ЦФ (цикло-спорин, азатиоприн) является препаратом иммуноподавляющей активности [15], вызывая иммунодефицит Т-клеток, путем стимулирования митоза этих клеток [16]. Ключевой системой продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) Т-клетками и другими иммуноактивными клетками (макрофаги, лимфоциты, фагоциты и т.д.) является NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая оксидаза, которая является комбинированным энзимом, состоящим из пяти изоформ цитохрома (цит) b_{558} с молекулярной массой: 40, 47, 67, 22 и 91 кДа [23]. Эти изоформы цит b_{558} локализованы не только в клеточных формированиях [17,22], но и в сыворотке крови и эритроцитарных мембранах (ЭМ) млекопи-

тающих [5]. Особое место занимают изоформы цит b_{558} сыворотки крови, которые оказывают высокую резистентность к перекиси водорода [4] и, возможно, играют определенную роль при развитии плода (уровень этих изоформ выше в сыворотке плацентарной крови женщин [5]). С другой стороны, уровень сывороточных цит b_{558} повышается при злокачественных новообразованиях, особенно в сыворотке крови женщин и в сыворотке крови других млекопитающих (крыса, бык) при аэробном инкубировании крови [1,5]. Предполагается, что изоформы цит b_{558} сыворотки крови являются экстрацеллюлярными агентами адаптивной иммунной системы крови [2]. Однако молекулярно-биохимические механизмы непосредственного воздействия ЦФ на течение образования сывороточных цит b_{558} в сыворотке крови и ЭМ крыс (самок и самцов), а также на уровень металлопротеинов антиоксидантной активности (МПА) *in vitro* еще не определены.

Целью работы является определение динамики изменения уровней NADPH-зависимой супероксидпродуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активности [3] изоформ цит b_{558} ЭМ и сыворотки, а также уровня и активности МПА после четырехдневного аэробного инкубирования крови крыс-самок и самцов в отсутствие и присутствии ЦФ.

Материал и методы

Стабилизированную в оксалатном буфере кровь (по 15 мл) белых половозрелых крыс-самок и самцов (массой 220-260 г) инкубировали с ЦФ (по 3,3 мг/мл) в течение четырех суток, при 4° в аэробных условиях (это оптимальный срок образования изоформ сывороточных цит b_{558} *in vitro* [2]). Выделение эритроцитов осуществлялось путем предварительного промывания физ. раствором осажденных эритроцитов, с дальнейшим отделением плазменных компонентов. Процедуру очистки эритроцитов физ. раствором повторяли дважды [7]. Эритроцитарные мембраны осаждали при pH=6 центрифугированием и промывали калий фосфатным буфером, pH=7.4. Промывание ЭМ продолжали до получения бесцветного супернатанта [8]. Далее осуществляли одновременное и комплексное получение, количественное и качественное определение (определение активности) металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) и МПА из этих проб крови (6 серий опытов).

МПА (Cu,Zn-СОД и каталаза – из цитоплазмы эритроцитов, церулоплазмин и трансферрин – из сыворотки крови) и МПА (суммарная фракция изоформ цит b_{558} I + цит b_{558} II сыворотки крови, цит b_{558} III – из ЭМ, цит b_6 – из цитоплазмы эритроцитов, супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол) получали универсальным биотехнологическим способом без использования детергента для солиubilизации суммарной фракции цит b_{558} ЭМ. Белковые фракции сыворотки

крови, цитоплазмы и ЭМ подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 и сефадексе ДЕАЕ А-50 [7,8].

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. СОД активности фракций и O_2^- -продуцирующую активность супрола и суммарной фракции изоформ цит b_{558} сыворотки крови и цит b_{558} III ЭМ в гомогенной фазе определяли нитротетразолиевым синим (НТС) путем вычисления процента ингибирования (для СОД) или стимулирования (для супрола или изоформ цит b_{558}) образования формаза при 560 нм в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности или O_2^- -продуцирующей активности принимали количество белка, которое подавляет или стимулирует образование формаза на 50% соответственно.

МетНб-восстанавливающую активность изоформ цит b_{558} определяли, используя ферригемоглобин (ферриНб) цитоплазмы эритроцитов крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения (при 565 нм) 0,8. При этом величина плотности бета-поглощения (A_{530}) изоформ цит b_{558} в реакционной смеси составляла 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствору ферриНб добавляли 0,2 мл изоформ 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 ферриНб до ферроНб путем измерения снижения плотности альфа-полосы поглощения ферриНб при 565 нм (это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроНб, который имеет максимальное поглощение при 555 нм). За единицу ферриНб-восстанавливающей активности изоформ цит b_{558} принимали количество белка, снижающее плотность максимального оптического поглощения ферриНб (при 565 нм) до 0,05 за 1 ч при 30°. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим методом, путем вычисления количества расщепленной перекиси водорода в отсутствие и присутствии каталазы. За единицу каталазной активности принимали количество белка, расщепляющее 0,1М перекиси водорода за 1 мин при 20°.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности P .

Результаты и обсуждение

Четырехдневное аэробное инкубирование крови в отсутствие и присутствии ЦФ вызывает неадекватные изменения уровней и активности МПА и МАА в крови крыс (самок и самцов). ЦФ (3,3 мг/мл) вызывает снижение уровня суммарной фракции сывороточных цит b_{558} I и b_{558} II крови крыс-самцов больше, чем самок. Возможно, этим путем ЦФ оказывает иммуносупрессорный эффект [15]. Такая закономерность наблюдается и у цит b_5 из цитоплазмы эритроцитов, а также у цит. b_{558} III ЭМ, более того, у самок уровень последнего показателя несколько повышается по сравнению с контролем (показатели в отсутствие ЦФ). ЦФ вызывает снижение и уровня супрола [6] у крыс-самцов, по сравнению с показателями самок (рис.1). ЦФ в приведенных условиях вызывает повышение O_2^- - продуцирующей

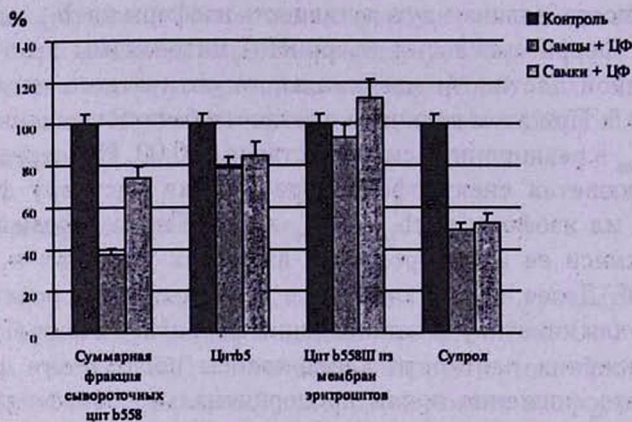


Рис. 1. Относительные изменения (%) уровня МПА сыворотки крови и ЭМ у крыс (самок и самцов) после 4-дневной инкубации крови в аэробных условиях при 4° с 3.3 мг/мл ЦФ, по сравнению со 100% контрольными показателями (показатели, полученные в отсутствие ЦФ), $P < 0.05$, $n = 4$

активности супрола крови самок и самцов в одинаковых диапазонах. В аналогичных условиях ЦФ приводит к повышению NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности изоформ цит b_{558} сыворотки крови самок намного больше, чем у самцов (рис.2). Фактически снижение уровня изоформ сывороточных цит b_{558} после инкубирования крови с ЦФ вызывает адекватное подавление активности адаптивной иммунной системы крови крыс-самцов [2]. Однако снижение уровня сывороточных цит b_{558} компенсируется повышением NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этих цит b_{558} . Повышение метHb-восстанавливающей активности изоформ цит b_{558} сыворотки свидетельствует о том, что адаптивная иммунная система крови в усло-

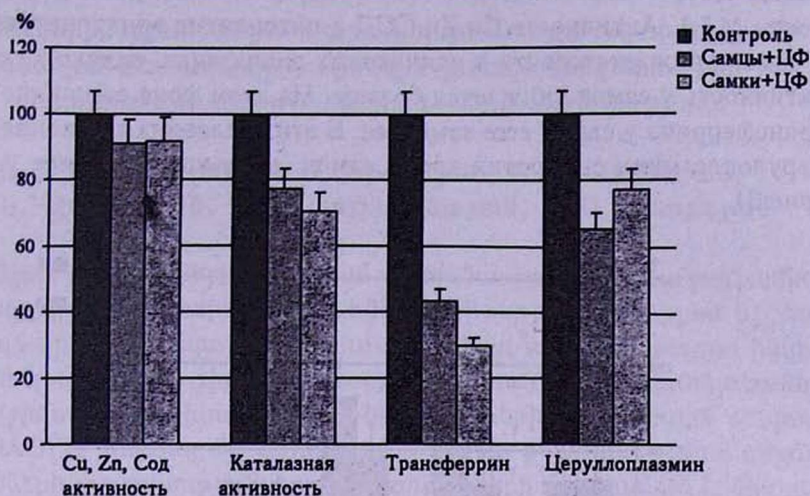


Рис. 2. Относительные изменения (%) активности антиоксидантных металлопротеинов эритроцитов и сыворотки крови у крыс после 4-дневной инкубации крови в аэробных условиях при 4° с 3.3мг/мл ЦФ, по сравнению со 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие ЦФ), $P < 0.05$, $n = 4$

виях *in vitro* может играть определенную роль для обеспечения нормального протекания кислородного гомеостаза при действии ЦФ, путем стимулирования образования ферроНб (оксиНб), который способен перенести молекулярный кислород к клеткам. Эта закономерность не сохраняется у цит b_{558} III ЭМ. По сравнению со 100% показателями крыс-самцов, инкубирование крови самок в приведенных условиях вызывает снижение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b_{558} III, особенно в присутствии ЦФ. Однако в этих условиях метНб-восстанавливающая активность цит b_{558} III ЭМ у крыс-самок несколько выше, чем у самцов, хотя под влиянием ЦФ происходит заметное снижение этой активности (рис.2).

Таким образом, в результате аэробного инкубирования крови крыс с ЦФ в приведенных условиях прооксидантная толерантность сыворотки крови (изменение уровня, NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности изоформ цит b_{558} сыворотки крови, а также супрола под влиянием ЦФ) крыс-самок повышает таковую у крыс-самцов. Однако прооксидантная толерантность ЭМ (изменение уровня, NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности цит b_{558} III ЭМ, а также уровня цит b_5 под влиянием ЦФ) меньше у крыс-самок, по сравнению с этими показателями у самцов. Это свидетельствует о том, что стабильность эритроцитов самок уступает таковой у самцов после аэробного инкубирования крови с ЦФ.

Четырехдневное аэробное инкубирование ЦФ с кровью крыс-самок и самцов приводит к неадекватным снижениям уровня и актив-

ности МАА. Активность Cu , Zn , СОД в цитоплазме эритроцитов самцов и самок снижается почти в одинаковых диапазонах, однако каталазная активность у самок снижается больше. На этом фоне снижение уровня трансферрина у самок еще заметнее. В этих условиях снижение уровня церулоплазмينا сыворотки крови самок превышает таковое у самцов (рис.3).

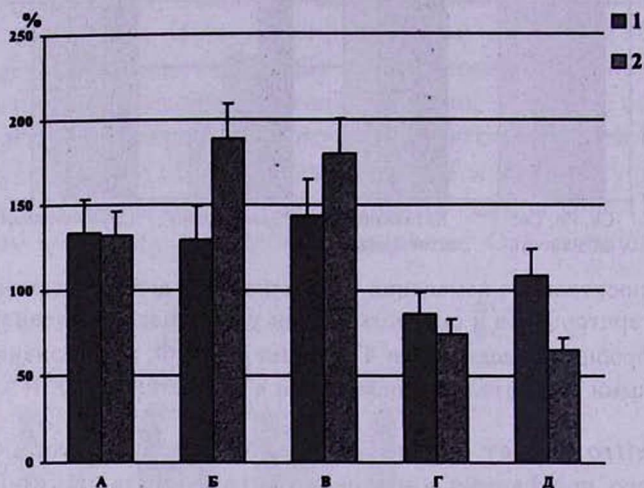


Рис. 3. Относительные изменения (%) O_2 -продуцирующей активности супрола (А), метНб-восстанавливающей (Б) и NADPH -зависимой O_2 -продуцирующей (В) активности суммарной фракции изоформ цит b_{558} I + цит b_{558} II сыворотки крови, NADPH -зависимой O_2 -продуцирующей (Г) и метНб-восстанавливающей (Д) активности цит b_{558} III ЭМ крыс-самок, по сравнению со 100 % показателями крыс-самцов в отсутствие (1) и присутствии (2) ЦФ, $P < 0.05$, $n=4$

Можно заключить, что в результате четырехдневного аэробного инкубирования крови крыс-самок и самцов с ЦФ при 4° прооксидантная толерантность сыворотки крови самок повышает таковую у крыс-самцов. Однако прооксидантная толерантность ЭМ меньше у самок, по сравнению с этими показателями у крыс-самцов. Это свидетельствует о том, что стабильность эритроцитов крыс-самок уступает таковой у самцов после аэробного инкубирования крови с ЦФ. С другой стороны, антиоксидантная толерантность крови (изменение уровня и активности МАА крови под влиянием ЦФ) самок в большинстве случаев ниже, чем у крыс-самцов. В этом аспекте при определении механизмов оксидативного повреждения крови млекопитающих необходимо учитывать пол экспериментальных животных.

**Առնետների արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ
օժտված մետաղապրոտեինների դիմադրողականության
տարբերությունները ցիկլոֆոսֆամիդի ազդեցությամբ**

**Լ.Հ. Թադևոսյան, Գ.Մ. Սիմոնյան, Մ.Ա. Սիմոնյան,
Լ.Ն. Առաքելյան, Ռ.Լ. Հայրապետյան, Գ.Ա. Գևորգյան**

Աերոբ պայմաններում 4°C-ում ուսումնասիրվել է ցիկլոֆոսֆամիդի (ՑՖ) ազդեցությունը արու և էգ առնետների արյան ցիտոքրոմ b_{558} համակարգի վրա: Այդ պայմաններում ՑՖ-ի հետ արյան քառօրյա ինկուբացման հետևանքով շիճուկի պրոօքսիդանտային դիմադրողականությունը (շիճուկային ցիտոքրոմ b_{558} -երի իզոմերների գումարային մակարդակի NADPH կախյալ O_2^- գոյացման և մեթՀբ վերականգնման ակտիվությունների փոփոխությունները) էգ առնետների մոտ աճում է, մինչդեռ էրիթրոցիտների թաղանթների պրոօքսիդանտային դիմադրողականությունը (ցիտ b_{558} -ի մակարդակի, NADPH կախյալ O_2^- գոյացման և մեթՀբ վերականգնման ակտիվությունների փոփոխությունները, ցիտ b_5 մակարդակի փոփոխությունները) նվազում է արուների համեմատությամբ: Սա վկայում է այն մասին, որ նշված պայմաններում էգ առնետների էրիթրոցիտների ակտիվությունը ավելի պակաս է, քան արուներիին: Ընդ որում, էրիթրոցիտների ցիտոպլազմայում տեղակայված Cu, Zn, UO₂-ի ակտիվությունը արու և էգ առնետների մոտ նվազում է նույն չափով, սակայն կատալազի ակտիվությունը պակասում է: Միաժամանակ տրանսֆերինի և ցերուլոպլազմինի մակարդակը էգ առնետների մոտ ավելի է նվազում, քան արուների մոտ:

Այսպիսով, ՑՖ-ը տարբեր ձևով է ազդում արու և էգ առնետների արյան ակտիվ թթվածնի նյութափոխանակությունը կարգավորող մետաղապրոտեինների վրա:

**Varieties in the tolerance of rat blood metalloproteins of anti-and
prooxidant activities after aerobic incubation of the blood with
cyclophosphamide**

**L.H. Tadevosyan, G.M. Simonyan, M.A. Simonyan, L.N. Arakelyan,
R.L. Hayrapetyan, G.A. Kevorkian**

A four-day aerobic incubation of female and male rats blood at 4°C with 3,3 mg/ml cyclophosphamide (CPH) lead to elevation of the serum prooxidative tolerance (changes of the levels, NADPH depending O_2^- -producing and methemoglobin-reducing activities of the total fraction of serum cytochrome b_{558} isoforms) of blood in female rats in comparison to the male rats. However, the prooxidative tolerance of erythrocyte membranes (changes of the level, NADPH depending O_2^- -producing and methemoglobin-reducing activities of cytochrome b_{558} III from

erythrocyte membranes) under the influence of CPH on the blood decreases in female rats in comparison to male rats. It is testified that the stability of female rats' erythrocytes is decreased in comparison to male rats erythrocytes after aerobic incubation of blood with CPH. In these conditions the Cu, Zn-SOD activities of female and male rats decrease considerably, while the catalase activity decreases in cytoplasm of the erythrocytes of the female rats. These changes are associated with the decrease in the levels of transferrin and ceruloplasmin in the blood serum of female rats.

Thus, the CHP in these conditions influences in various types on the regulating systems (the anti- and prooxidative metalloproteins) of reactive oxygen metabolism in the blood of female and male rats.

Литература

1. Симосян Г.М. Цитохром b_{558} из сыворотки венозной крови человека и дисбаланс между уровнями металлопротеинов с острым лимфобластическим и миелобластическим лейкозом. Мед.наука Армении НАН РА, 2002, т. XLII, 2, с.101-103.
2. Симосян Г.А., Симосян Р.М., Симосян М.А. Образование сывороточных цитохромов b_{558} в результате инкубирования крови *in vitro*. Мед.наука Армении НАН РА, 2005, т. XLV, 2, с.26-29.
3. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Симосян М.А., Галоян А.А. Влияние обогащенного пролином полипептида на восстановление метгемоглобина и образования супероксида под влиянием цитохрома b_{558} III и супрола *in vitro*. Нейрохимия, 2007, т.24, 1, с.37-40.
4. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Симосян М.А. Высокая резистентность сывороточных цитохромов b_{558} I и b_{558} II против перекиси водорода по сравнению с другими гемопротеинами. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Сборник докладов научной конференции ЕРГМУ им.М.Гераци. Ереван, 1999, с.48-51.
5. Симосян М.А., Бабаян М.А., Симосян Г.М. Цитохромы b_{558} из сыворотки крови и мембран эритроцитов. Выделение, очистка, краткие характеристики. Биохимия, 1995, т.60, 2, с.1977-1987.
6. Симосян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симосян Р.М. NADPH содержащая, супероксидпродуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови. Выделение, очистка, краткая характеристика и механизм действия. Биохимия, 1996, т.61, 5, с.932-938.
7. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. N 341 Армпатента, Ереван, 1997.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N 908 Армпатента, Ереван, 2001.
9. Colvin O.M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. Curr.Pharm.Des., 1999, Vol. 5, 8, p.555-560.
10. Elangovan S., Chidambaram P., Yenjerla M., Palaminathan V. Protective effect of DL- α -lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. Reproductive Toxicol., 2004, Vol. 19, 2, p.163-167.
11. Jawaharlal M.P., Edward R.B. Cyclophosphamide-induced depression of the lung. Pulmonary Med., 1985, Vol. 8, 2, p.153-165.
12. Korkmaz A., Topal T., Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis, implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. Cell Biol.Toxicol., 2007, Vol. 23, 5, p.303-312.
13. Proietti E., Greco G., Garrone B. et.al. Importance of cyclophosphamide-induced bystander

effect on T-cells for a successful tumor eradication in response to adaptive immunotherapy in mice. *J.Clim.Invest.*, 1998, Vol.101, 2, p.429-441.

14. *Rech Franke S.I., Pra D., Da Silva J. et al.* Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO_4 and CuSO_4 in mouse blood cells in vivo. *Mutant.Res.Genetic Toxicol. Environment.Mutagenesis*, 2005, Vol.583, 1, p.75-84.
15. *Schellekens P.T., Ten Berge R.J.* The effects of immunosuppressive drugs on human immunocompetence. *Pharm. Weekbl.Sci.*, 1984, Vol.6, 1, p.32-38.
16. *Shimizu M., Sabolovic D., Ozawa H., Iwaguchi T.* Cyclophosphamide-induced suppressor cells in nude mice. *Anticancer Drugs*, 1992, Vol.3, 4, p.427-433.
17. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A.* Stimulation of the NADPH depending superoxide-producing and methemoglobin-reducing activities of new isoforms of cytochrome b_{558} by PRP-1 and G_xNH_2 . *Neurochem.Res.*, 2008, Vol.33, p.1155-1156.
18. *Stankiewicz A., Skrzydlewska E., Makiela A.* Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug metabolism and drug interactions*, 2002, Vol.19, 2, p.67-82.
19. *Sulkowska M., Sulkowski S., Skrzydlewska E. et al.* Cyclophosphamide-induced generation of ROS. Comparison with morphological changes in type II alveolar epithelial cells and lung capillaries. *Exp.Toxicol.Pathol.*, 1998, Vol.50, 3, p.209-220.
20. *Topal T., Oztas Y., Korkmaz A. et al.* Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. *J.Pineal Res.*, 2005, Vol.38, 4, p.272-277.
21. *Tsai-Turton M., Luong B.T., Youming T., Luderer U.* Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol.Sci.*, 2007, Vol.98, 1, p.216-230.
22. *Ushio-Fukai M.* Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *SciSTKE*, 2006Aug 22; 2006(349):re8
23. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanisms. *Cell Mol.Sci.*, 2002, Vol.59, 9, p.1428-1459.