

# КУРСОВОЕ ВВЕДЕНИЕ ЦИКЛОФОСФАМИДА НАРУШАЕТ АМИНОКИСЛОТНЫЙ БАЛАНС В ТКАНИ ТИМУСА КРЫС

*Павлюковец А.Ю., Шейбак В.М., Домостой Т.С., Смирнов А.Ю.*

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
Гродно, Республика Беларусь*

**Реферат.** В ткани тимуса введение циклофосфамида снижает общее содержание свободных аминокислот и их азотсодержащих производных, концентрации аспартата, глутамата, цитруллина, цистатионина, аланина и увеличивает содержание триптофана, которое сохраняется на протяжении 8 сут после последнего введения циклофосфамида.

**Ключевые слова:** циклофосфамид, свободные аминокислоты, тимус.

**Summary.** Cyclophosphamide administered reduces the total content of free amino acids and nitrogenous derivatives concentrations aspartate, glutamate, citrulline, cystathionine, alanine, increases the amount of tryptophan, that is stored for 8 days after the last dose of cyclophosphamide in the thymus tissue.

**Keywords:** cyclophosphamide, free amino acids, thymus.

**Введение.** Среди препаратов иммуносупрессорного действия широкое распространение получил циклофосфамид, который включен во многие схемы противоопухолевой терапии, используется для профилактики отторжения трансплантатов, а также для лечения аутоиммунных заболеваний. Ингибирование функциональной активности клеток иммунной системы является одним из основных побочных эффектов токсического действия циклофосфамида [5]. Циклофосфамид стимулирует апоптоз, подавляет образование и пролиферацию лимфоидных клеток, вызывая лейкопению и анемию. Метаболиты циклофосфамида (акролеины) обладают способностью вступать в реакции с транспортными, мембранными и цитоплазматическими белками, что ведет к повреждению ДНК и инициации оксидативного стресса в быстро пролиферирующих клетках [2]. В результате образования активных форм кислорода в клетках и происходящего одновременно алкилирования ферментов и структурных белков метаболиты циклофосфамида нарушают целостность плазматических и митохондриальных мембран, изменяют функционирование комплексов электронтранспортной цепи, а также активность АТФ-синтетазы и проницаемость ионных каналов на внутренней мембране митохондрий, что приводит к разобщению процесса клеточного дыхания, возникновению гипознергетического состояния и амплификации генерации свободных радикалов [1].

После однократного введения циклофосфамида животным (20 мг/кг массы) число Т-лимфоцитов снижается на 50%, а при увеличении дозы до 200 мг/кг массы происходит практически полное исчезновение Т-лимфоцитов [3]. Наблюдается атрофия тимуса вследствие апоптоза тимоцитов и фрагментирования ДНК [4].

Все перечисленные выше изменения в клетках после введения циклофосфамида — главным образом окислительный стресс и повреждение генетического аппарата — влияют на интенсивность белкового обмена в тканях, включая тимус. Между тем, несмотря на широкое экспериментальное и практическое применение циклофосфамида и важность оценки состояния аминокислотно-белкового обмена для разработки способов профилактики негативного влияния цитостатика на здоровые ткани, отсутствуют сведения о его влиянии на аминокислотный баланс в крови и тканях.

**Цель** исследования — определение баланса свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в тимусе после курсового введения циклофосфамида.

**Материалы и методы.** В работе использованы крысы-самцы массой 110–120 г, циклофосфамид вводили в общей дозе 160 мг/кг (по 40 мг/кг 4 раза с интервалом 48 ч внутрибрюшинно), животных декапитировали на 11, 14 и 18-е сут эксперимента. Определение свобод-

ных аминокислот в ткани тимуса производили методом обращенно-фазной ВЭЖХ. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных выполнена с использованием пакета программ Statistica 6.0 и Excel 2002. Были вычислены средняя арифметическая (M), средняя ошибка средней (m) и достоверность различий средних величин (P), существенность которой считается, если величина этого показателя меньше 0,05 ( $P < 0,05$ ). Достоверность различий значений определяли по таблице Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Через 24 ч после последнего введения циклофосфамида снижалось общее количество свободных аминокислот и их производных (с  $37117 \pm 831$  до  $27790 \pm 824$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), сумма протеиногенных аминокислот (с  $22874 \pm 668$  до  $16983 \pm 528$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), общее количество заменимых (с  $20727 \pm 651$  до  $14544 \pm 404$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ) и незаменимых аминокислот (с  $4373 \pm 118$  до  $3520 \pm 306$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), общее содержание производных аминокислот (с  $14258 \pm 229$  до  $10837 \pm 835$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), сумма серосодержащих аминокислот (с  $11498 \pm 211$  до  $9180 \pm 822$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ). Эти изменения явились результатом падения концентраций аспартата (на 39%), цитруллина (на 39%), глутамата (на 33%), аспарагина (на 51%),  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты (на 29%), глутамина (на 24%), фосфоэтанолamina (на 47%), глицина (на 23%), аланина (на 52%), таурина (на 19%) и цистатионина (на 92%). Хотя в 2 раза в тимусе увеличивались концентрации  $\alpha$ -аминомасляной кислоты и триптофана.

На 4-е сут в ткани тимуса животных, получавших циклофосфамид, сохранялось снижение общего количества свободных аминокислот и их производных ( $23491 \pm 2059$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), общего содержания протеиногенных аминокислот ( $14332 \pm 1416$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), заменимых ( $12414 \pm 1234$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ) и незаменимых аминокислот (с  $4373 \pm 118$  до  $3038,7 \pm 326,18$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), сумма производных аминокислот (с  $14258 \pm 229$  до  $9181 \pm 782$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ) и серосодержащих аминокислот ( $7741 \pm 5711$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), а также уменьшалось соотношение заменимые/незаменимые аминокислоты ( $4,1 \pm 0,16$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ). На 4-е сут в ткани тимуса продолжали оставаться сниженными уровни аспартата (на 44%), глутамата (на 48%), аспарагина (на 66%),  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты (на 53%), глутамина (на 34%), глицина (на 36%), фосфоэтанолamina (на 52%), цитруллина (на 37%), аргинина (на 25%),  $\beta$ -аланина (на 35%), аланина (на 50%), таурина (на 32%),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (на 54%),  $\alpha$ -аминомасляной кислоты (на 33%), этаноламина (на 26%), метионина (на 37%), цистатионина (на 96%). Существенно повышалась концентрация триптофана (в 1,5 раза), ключевой аминокислоты, контролирующей пролиферативные процессы клеток иммунной системы.

На 8-е сут после отмены цитостатика в ткани тимуса продолжало оставаться сниженным общее количество свободных аминокислот и их производных ( $29360 \pm 1520$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), общее содержание протеиногенных аминокислот ( $17026 \pm 1024$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), заменимых ( $15032 \pm 1062$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ) и незаменимых аминокислот ( $3240 \pm 140$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ), суммы производных аминокислот ( $12355 \pm 872$  нмоль/г,  $p < 0,05$ ). Сохранялись в своем большинстве изменения со стороны отдельных аминокислот. Были снижены уровни аспартата (на 27%), глутамата (на 33%), аспарагина (на 30%), глутамина (на 25%), треонина (на 17%), цитруллина (на 58%),  $\beta$ -аланина (на 20%), аланина (на 44%),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (на 40%), тирозина (на 19%),  $\alpha$ -аминомасляной кислоты (на 28%), цистатионина (на 73%) и повышены концентрации триптофана (в 1,5 раза), фенилаланина (в 1,1 раза) и орнитина (в 1,2 раза).

**Заключение.** В ткани тимуса введение циклофосфамида снижает общее содержание свободных аминокислот и их азотсодержащих производных, которое сохраняется на протяжении 8 сут после последнего введения циклофосфамида. Уменьшение аминокислотного фонда может быть причиной торможения процессов синтеза азотистых оснований, в которых наиболее активное участие принимают аспартат и глутамат, процессов трансляции и уменьшения антиоксидантной защиты тимоцитов вследствие снижения синтеза трипептида глутатиона. Для синтеза глутатиона требуется достаточное количество глутамата, глицина и лимитирующей синтез трипептида аминокислоты цистеин. Нами доказано снижение концентраций аспартата, глутамата,

цитруллина, цистатионина, аланина и увеличение содержания триптофана. Увеличение концентрации триптофана в иммунocyтaх может нарушать нормальное течение иммунных реакций.

### **Литература**

1. Cai, J. Protein modification by acrolein: Formation and stability of cysteine adducts / J. Cai, A. Bhatnagar, W.M. Pierce // *Jr. Chem. Res. Toxicol.* — 2009. — Vol. 22, № 4. — P. 708–716.
2. Cyclophosphamide induced apoptosis in cov434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion / M. Tsai-Turton [et al.] // *Toxicol. Sci.* — 2007. — Vol. 98, № 1. — P. 216–230.
3. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide / Y. Motoyoshi [et al.] // *Oncol. Rep.* — 2006. — Vol. 16, № 1. — P. 141–146.
4. Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus / S.M. Singh [et al.] // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* — 2007. — Vol. 29, № 1. — P. 17–30.
5. Zusman, I. T cell kinetics and apoptosis in immune organs and mammary tumors of rats treated with cyclophosphamide and soluble tumor-associated antigens / I. Zusman, G. Kossoy, H. Ben-Hur // *In vivo.* — 2002. — Vol. 16, № 6. — P. 567–576.