

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 (М), средняя ошибка средней (m) и достоверность различий средних величин (Р), 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 ± 831 до 27790 ± 824 нмоль/г, $p < 0,05$), сумма протеиногенных аминокислот (с 22874 ± 668 до 16983 ± 528 нмоль/г, $p < 0,05$), общее количество заменимых (с 20727 ± 651 до 14544 ± 404 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот (с 4373 ± 118 до 3520 ± 306 нмоль/г, $p < 0,05$), общее содержание производных аминокислот (с 14258 ± 229 до 10837 ± 835 нмоль/г, $p < 0,05$), сумма серосодержащих аминокислот (с 11498 ± 211 до 9180 ± 822 нмоль/г, $p < 0,05$). Эти изменения явились результатом падения концентраций аспартата (на 39%), цитруллина (на 39%), глутамата (на 33%), аспарагина (на 51%), α -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 α -аминомасляной кислоты и триптофана.

На 4-е сут в ткани тимуса животных, получавших циклофосфамид, сохранялось снижение общего количества свободных аминокислот и их производных (23491 ± 2059 нмоль/г, $p < 0,05$), общего содержания протеиногенных аминокислот (14332 ± 1416 нмоль/г, $p < 0,05$), заменимых (12414 ± 1234 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот (с 4373 ± 118 до $3038,7 \pm 326,18$ нмоль/г, $p < 0,05$), сумма производных аминокислот (с 14258 ± 229 до 9181 ± 782 нмоль/г, $p < 0,05$) и серосодержащих аминокислот (7741 ± 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%), α -аминоадипиновой кислоты (на 53%), глутамина (на 34%), глицина (на 36%), фосфоэтанолamina (на 52%), цитруллина (на 37%), аргинина (на 25%), β -аланина (на 35%), аланина (на 50%), таурина (на 32%), γ -аминомасляной кислоты (на 54%), α -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 ± 1520 нмоль/г, $p < 0,05$), общее содержание протеиногенных аминокислот (17026 ± 1024 нмоль/г, $p < 0,05$), заменимых (15032 ± 1062 нмоль/г, $p < 0,05$) и незаменимых аминокислот (3240 ± 140 нмоль/г, $p < 0,05$), суммы производных аминокислот (12355 ± 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%), β -аланина (на 20%), аланина (на 44%), γ -аминомасляной кислоты (на 40%), тирозина (на 19%), α -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.