

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО ПУЛА ПЛАЗМЫ КРОВИ  
ПРИ СОЛИДНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ  
ТИОФОСФОРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ CHELIODONIUM MAJUS L.**

А.А. Глазев, Смирнов В.Ю, Каравай А.В., Дорошенко Е.М., Нефёдов Л.И.

*Научно-исследовательская лаборатория биохимии биологически активных веществ*

*НИС Гродненского государственного университета им. Янки Купалы,*

*Гродно, Республика Беларусь*

**Введение**

В настоящее время продолжает расти число больных с патологией, в генезе которой ведущее место отводится нарушениям метаболизма аминокислот и формирования их внутриклеточного фонда. Наиболее актуальной в данном случае является проблема патогенетической роли изменений в метаболизме аминокислот, а также связанная с этим оптимизация способов терапии и целенаправленной метаболической коррекции злокачественных заболеваний [1].

Установлено, что относительная нормализация аминокислотного фонда в организме опухоленосителя является одним из достоверных критериев эффективности терапии, а аминокислотный спектр самой опухоли служит своеобразным маркером её неконтролируемого роста, степени инвазии, метастазирования и ранних рецидивов [1].

Ранее в экспериментальных [2] и клинических [3-6] исследованиях нами было убедительно доказано, что применение противоопухолевого иммуномодулятора и цитостатика NSC-631570 – полусинтетического препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого при злокачественном росте значительно изменяет уровни отдельных аминокислот и дериватов в плазме крови и опухолях человека и животных [7,8]. Эти изменения не могли быть полностью объяснены только с позиций известного действия злокачественного роста на процессы обмена аминокислот в организме опухоленосителя [1].

Мало того, оказалось, что на фоне применения препарата NSC-631570 у опухоленосителей в плазме крови, печени и опухолевой ткани наиболее значительно изменяются концентрации аминокислот (лейцин, пролин, глутамин, цистин) и их дериватов (таурин), прямо или опосредованно регулирующих процессы формирования противоопухолевого ответа, иммуногенез, онкогенез и апоптоз [5,6].

**Цель:** Исследование прямого действия NSC-631570 на аминокислотный пул плазмы крови онкологических больных предпринято нами с позиций неоднократно

доказанного независимыми методами специфического взаимодействия препарата с опухолевыми клетками и их структурными компонентами, включая клеточные мембраны иммунокомпетентных клеток [9].

#### **Методы исследования**

В исследование включены 20 больных с основными локализациями диагностированного онкологического процесса при их поступлении на лечение в онкогематологический стационар и 10 здоровых доноров.

Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными гистологических исследований операционного или биопсийного материала. Нозологическое распределение больных представлено в табл.1.

**Таблица 1**

**Сводная таблица включенных в исследование больных**

<b>№ групп</b>	<b>Клинический диагноз</b>	<b>Количество больных</b>
1	Здоровые доноры	10
Злокачественные солидные опухоли		
2	Рак желудка	4
3	Колоректальный рак	6
4	Рак молочной железы	3
5	Рак мочевого пузыря	2
6	Рак предстательной железы	2
7	Рак легкого (эпидермоидный вариант)	3

Больные с солидными злокачественными опухолями специальным методам лечения до исследования не подвергались (первичные больные).

Цельную кровь (5,0 мл) из локтевой вены утром натощак забирали в гепаринизированные пробирки при поступлении больных в стационар или в день взятия донорской крови.

1 мл цельной крови переносили в микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf, дополнительно внося 100 мкл препарата в разведениях 1:5, 1:10, 1:100 или 1:1000. Конечная концентрация препарата в пробе составляла соответственно 20, 10, 1, 01 мкг/мл. Контролем служили образцы цельной крови с внесением или без добавления в неё воды.

Полученные образцы цельной крови инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 150 минут. Плазму после их инкубации получали центрифугированием в течение 15 мин при 1500 об/мин в центрифуге "Biofuge Primo"(Germany). После этого фракции плазмы крови депротеинизировали, смешивая их с равным объёмом 1М HClO<sub>4</sub>, и центрифугировали в течение 20 мин при 12000g. В качестве внутреннего стандарта использовали гомо таурин ("Sigma") в концентрации 300 мкМ.

Полученные супернатанты кислотных безбелковых экстрактов до аналитического цикла определения свободных аминокислот и их производных хранились в течение всего времени при t -20°C.

Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводилась на ВЭЖХ - системе Agilent 1100 (Agilent Technologies).

Свободные аминокислоты и их производные разделяли методом обращённо-фазной хроматографии на колонке Диасорб 130 C<sub>16</sub> T (6 мкм), размером 3x250 мм (Элсико, Россия) с изократическим элюированием (0,1 М натрий-ацетатный буфер pH 5,71 + CH<sub>3</sub>OH 17,5%) при скорости потока 0,6 мл/мин, температуре 30°C после предколонной дериватизации с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и флуориметрическим детектированием (231/445 нм). В качестве стандарта использовали искусственную смесь L-аминокислот ("Fluka AG", Germany), по 100 мкМ каждого соединения.

Результаты исследований обрабатывались с помощью программы "Statistica": методами t-статистики, а так же методами многомерного статистического исследования и математического моделирования.

Это позволило исследовать систему признаков (концентрации аминокислот и их дериватов, добавленная концентрация препарата NSC-631570 при различных локализациях опухолевой болезни), свойства которой в значительной степени определяются взаимосвязями между перечисленными параметрами, и при помощи числовых значений охарактеризовать её многомерными законами распределения [10].

Преимуществом применяемых нами методов является минимальное искажение самой структуры выборок, снижающее субъективность при дискриминации групп и интерпретации главных компонент, обеспечивающее тем самым высокую воспроизводимость получаемых результатов [11].

## **Результаты и обсуждение**

По сравнению с практически здоровыми донорами в плазме крови больных солидными злокачественными новообразованиями наблюдается избирательное действие тиофосфорных производных алкалоидов чистотела на содержание  $\alpha$ -аминокислот с положительно заряженными (гистидин, аргинин) или незаряженными полярными (тирозин, треонин, глутамин) радикальными группами (табл.2).

При этом в плазме крови больных злокачественными новообразованиями при инкубации их цельной крови с препаратом по сравнению с практически здоровыми донорами статистически достоверно снижено содержание гистидина и повышен уровень  $\beta$ -аланина и таурина. Изменения в концентрациях перечисленных L-аминокислот значимо зависели от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого, содержащихся в препарате.

Таблица 2

Концентрации значимо изменяющихся свободных  $\alpha$ -аминокислот в плазме крови у больных с солидными злокачественными новообразованиями (после добавления препарата NSC-631570 в концентрации 20 мкг/мл), мкмоль/л.

<b>Аминокислоты</b>	<b>Здоровый контроль</b>	<b>Рак желудка</b>	<b>Рак ободочной и прямой кишки</b>	<b>Рак легкого</b>
Gln	317,40 ± 53,34	419,28 ± 25,97	393,62 ± 32,61	323,498 ± 43,084
His	81,78 ± 2,99	49,93 ± 5,70*	59,60 ± 5,96*	57,57 ± 10,20*
Thr	130,35 ± 11,39	108,16 ± 16,15	89,59 ± 10,71*	129,39 ± 30,69
PEA	22,30 ± 2,25	11,34 ± 1,98*	12,93 ± 1,86*	9,32 ± 1,30*
Arg	20,76 ± 2,90	44,41 ± 11,53*	47,24 ± 7,74*	60,19 ± 11,59*†
Tau	133,76 ± 18,92	82,71 ± 5,74	118,62 ± 25,36	87,22 ± 8,86
bAla	8,57 ± 3,76	6,47 ± 1,18	9,70 ± 2,43	6,72 ± 0,66
Ala	214,72 ± 14,97	187,38 ± 16,30	164,75 ± 10,17*	194,008 ± 30,092
Tyr	175,47 ± 7,92	84,56 ± 3,54*†	101,65 ± 7,09*†	106,86 ± 15,32*†
<b>Аминокислоты</b>	<b>Здоровый контроль</b>	<b>Рак молочной железы</b>	<b>Рак мочевого пузыря</b>	<b>Рак предстательной железы</b>
Gln	317,40 ± 53,34	552,16 ± 66,91*	261,11 ± 8,64	256,94 ± 57,61
His	81,78 ± 2,99	50,78 ± 4,42*	56,86 ± 21,32*	46,97 ± 3,53*
Thr	130,35 ± 11,39	120,72 ± 7,36	87,46 ± 9,48	86,386 ± 29,057

PEA	22,30 ± 2,25	4,715 ± 0,605*†	11,093 ± 1,383	10,45 ± 4,23
Arg	20,76 ± 2,90	47,18 ± 4,27*	49,94 ± 0,45*	34,94 ± 13,22
Tau	133,76 ± 18,92	99,55 ± 9,87	92,32 ± 8,44	81,71 ± 13,72
bAla	8,57 ± 3,76	11,55 ± 1,83	6,19 ± 2,62	11,15 ± 3,51
Ala	214,72 ± 14,97	207,99 ± 12,10	207,37 ± 63,30	204,005 ± 45,682
Tyr	175,47 ± 7,92	125,46 ± 4,01*	101,66 ± 9,92*†	97,92 ± 12,35*†

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в группе здорового контроля по  $t$ -критерию Стьюдента;

† –  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в группе здорового контроля по критерию Тьюки (unequal HSD) методом дисперсионного анализа;

Одновременно видно, что только при добавлении в концентрации 20 мкг/мл, препарат NSC-631570 значительно влиял на концентрацию тирозина (табл.2).

В зависимости от локализации опухоли (рак ободочной, прямой кишки, молочной железы) значимые изменения, индуцированные добавлением препарата NSC-631570, помимо уровня тирозина зарегистрированы также в уровнях гистидина (при раке молочной железы) и таурина (при раке лёгкого).

Таким образом, при сравнении результатов с применением  $t$ -критерия Стьюдента нами получены доказательства различного действия тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого на уровни свободных L-аминокислот в плазме крови практически здоровых доноров и онкологических больных в зависимости от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации препарата.

Нами анализировались также корреляционные связи между уровнями исследованных аминокислот и добавленной концентрацией препарата. В плазме крови больных раком желудка, ободочной, прямой кишки, молочной железы, мочевого пузыря или предстательной железы только уровень тирозина коррелировал с добавленной концентрацией NSC-631570, а при раке лёгкого значимой зависимости между уровнями свободных аминокислот в плазме крови и концентрацией NSC-631570 не выявлено (табл. 3).

С целью выявления эффектов тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.*, общих для всех исследованных опухолевых процессов, на уровни определяемых нами соединений был проведен дискриминантный анализ.

Из графика двух главных компонент (рис. 1), полученного при проведении канонического анализа, видно, что препарат оказывает наиболее выраженное действие на

пул свободных аминокислот плазмы крови больных при добавлении его в концентрации 20 мкг/мл. Это доказываются значениями  $D^2$ -Махаланобиса для групп с указанной добавленной концентрацией алкалоидов — её удалением от остальных групп относительно первой главной компоненты, которая определяется в основном концентрациями тирозина, треонина и аспарагина.

Таблица 3

Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между добавленной концентрацией препарата NSC-631570 и уровнями аминокислот в плазме крови

(\* – значимые коэффициенты на уровне достоверности  $p < 0,05$ ) (Условные обозначения групп - в таблице 1)

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Asp</b>	0,08	-0,14	0,14	0,13	0,27	-0,54	0,16
<b>Asn</b>	-0,08	-0,09	-0,03	-0,10	-0,39	-0,39	0,25
<b>Glu</b>	-0,11	0,02	-0,06	-0,43	0,39	0,12	0,17
<b>Ser</b>	0,04	-0,14	-0,01	-0,18	-0,07	-0,05	0,02
<b>Gln</b>	0,11	-0,26	-0,18	0,37	-0,25	-0,49	0,24
<b>His</b>	0,13	0,05	0,20	0,15	0,15	0,00	-0,08
<b>Gly</b>	0,10	-0,14	-0,00	-0,12	-0,15	0,02	-0,19
<b>Thr</b>	-0,09	-0,06	-0,14	-0,08	-0,30	-0,20	0,31
<b>PEA</b>	0,29*	0,06	0,06	-0,07	0,05	0,12	0,39
<b>Arg</b>	0,00	-0,46	-0,21	-0,04	0,34	-0,25	-0,07
<b>Tau</b>	0,21	-0,25	-0,06	0,19	0,54	-0,39	-0,28
<b>bAla</b>	0,38*	0,08	-0,10	0,19	0,05	-0,34	-0,25
<b>Ala</b>	-0,11	-0,09	-0,26	-0,11	-0,02	-0,32	0,24
<b>Tyr</b>	0,73*	0,60*	0,66*	0,65*	0,76*	0,66*	0,44

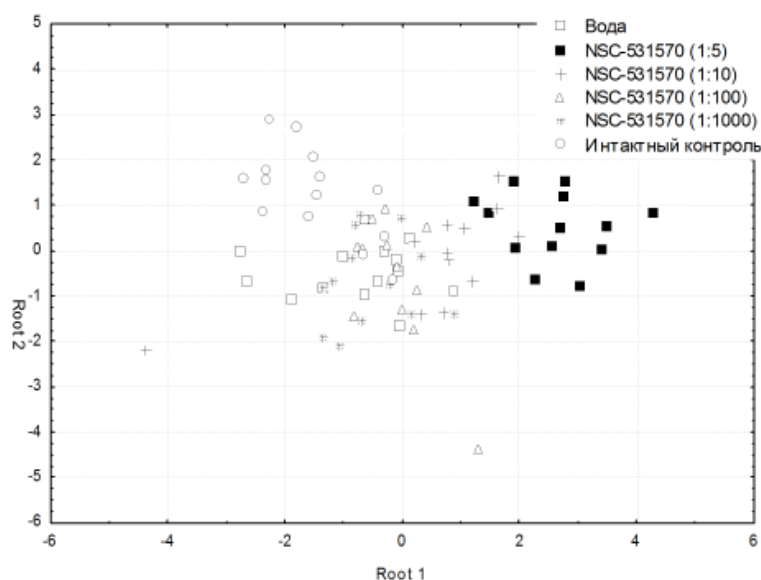


Рис. 1. Проекция на плоскость двух главных компонент при анализе различных концентраций добавленного препарата NSC-631570 без учета локализации опухолевого процесса

Одновременно, из рис. 1 следует, что препарат при добавлении в концентрации 10 мкг/мл также оказывал эффект на уровни аминокислот в плазме крови больных, однако выраженность этого действия при оценке значений  $D^2$ -Махаланобиса, меньше, а в разведении 1:100 и 1:1000 (1 и 0,1 мкг/мл соответственно) препарат достоверно не влиял на содержание исследуемых соединений в плазме крови онкологических больных.

При этом, основываясь на значениях коэффициентов Фишера, наиболее значимыми следует считать уровни таурина, тирозина, треонина, аспартата и глицина.

Из графика двух главных компонент (рис. 2), полученного при проведении канонического анализа видно, что при различных локализациях опухолевого процесса, солидные злокачественные новообразования образуют 4 группы (рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка и остальные злокачественные опухоли), различающиеся по чувствительности к действию тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого.



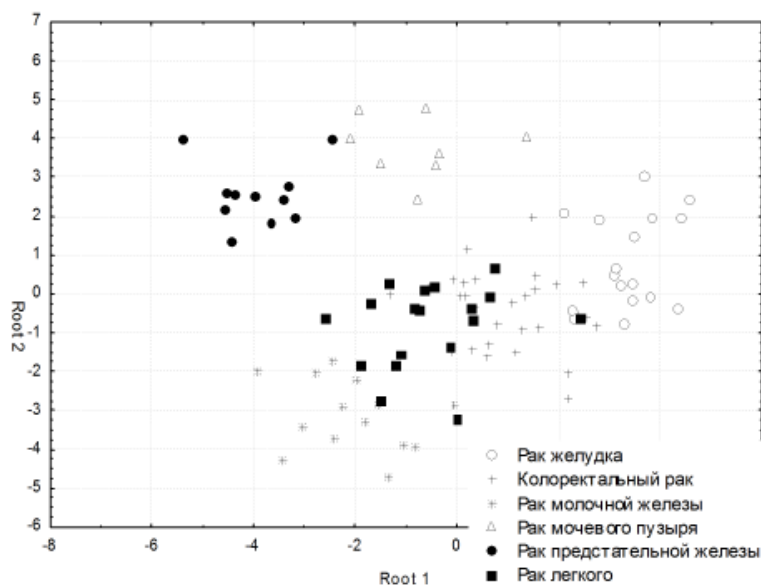


Рис. 2. Проекция на плоскость двух главных компонент при анализе различных локализаций опухолевого процесса

Таким образом, при анализе данных с применением *t*-критерия Стьюдента и многокомпонентного анализа нами получены доказательства различного действия препарата NSC-631570 на уровни свободных L-аминокислот и соотношения между их концентрациями в плазме крови практически здоровых доноров и онкологических больных в зависимости от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации препарата.

Полученные результаты позволяют, в целом, нам предложить вероятный механизм канцеростатического действия препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого – это изменение фонда свободных аминокислот плазмы крови, посредством регуляции метаболических путей на уровне транспорта, реакций промежуточного обмена аминокислот (влияние на функциональное состояние и активность группы ферментов, участвующих в метаболизме аминокислот: реакции трансаминирования, дезаминирования, декарбоксилирования) и азотистого обмена в плазме крови в целом, определяющих активность и характер процессов злокачественного роста. Изменение соотношения свободных аминокислот плазмы крови, являющихся

незаменимым пластическим субстратом для роста и деления опухолевых клеток и синтеза в них белка *de novo*, и является вероятным механизмом противоопухолевого действия препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела.

#### **Список литературы:**

1. Lubec, C. Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine) / C. Lubec, J.A. Rosental. – N.Y.: Escom, 1990. – 1196 p.
2. Nefyodov, L.I. Metabolic control and treatment of malignant growth: tumor development, patterns of amino acid imbalance and Ukrain / L.I. Nefyodov [et al] // Int. J. Immunotherapy. – 2003. – Vol. 19, № 2-4. – P.109–114.
3. Nefyodov, L.I. Amino acids and their derivatives in blood plasma of patients with breast cancer treated with Ukrain / L.I. Nefyodov [et al] // Drugs Exptl. Clin. Res. – 1996. – Vol. 22, № 5. – P. 83 - 86.
4. Nefyodov, L.I. Amino acids and their derivatives in tumour tissue from patients with breast cancer treated with Ukrain / L.I. Nefyodov [et al] // Drugs Exptl. Clin. Res. – 1996. – Vol. 22, № 6. – P. 87 - 90.
5. Nefyodov, L.I. New biochemical mechanisms of the anticancer effect of Ukrain in the treatment of cancer of the urinary bladder. / L.I. Nefyodov [et al] // Drugs Exptl. Clin. Res. – 2000. – Vol. 26, № 5/6. – P. 195-199.
6. Nefyodov, L.I. Comparative evaluation of blood plasma and tumor tissue amino acid pool in radiation or neoadjuvant preoperative therapies of breast cancer with the antitumor drug Ukrain / L.I. Nefyodov [et al] // Drugs Exptl. Clin. Res. – 2000. – Vol. 26, № 5/6. – P. 231–237
7. Nowicky, W. The effect of NSC 631570 on amino acid profile as a possible assay for early cancer diagnostics / W. Nowicky [et al] // Intern. Symp. Clinical Biomarker Summit, Coronado, USA, March 29-31, 2006. – Coronado, 2006. – P. 25
8. Nefyodov, L.I. Metabolic control and treatment of malignant growth: tumor development, patterns of amino acid imbalance and Ukrain / L.I. Nefyodov [et al] // The FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272, № 1. – P. 558.
9. Liepins, A. Induction of Bimodal Programmed Cell Death in Malignant Cells by the Derivative Ukrain (NSC-631570) / A. Liepins [et al] // Drugs Exptl. Clin. Res. – 1996. – Vol. 22. – P. 1-8
10. Winer, B. J. Statistical principals in experimental design / B.J. Winer, D.R. Brown, K.M. Michels. – 3-rd ed. – N.Y.: McGraw-Hill, 1991. – 380 p.

11. Montgomery, D.C. Applied Statistics and Probability for Engineers / D.C. Montgomery, G.C. Runger. – 3-rd ed. – N.Y.: John Wiley & Sons, 2002. – 325 p.

CHARACTERISTICS OF CHANGES OF THE AMINO ACID POOL OF PLASMA BLOOD  
IN SOLID MALIGNANT GROWTH UNDER INFLUENCE OF THIOPHOSPHORIC  
DERIVATIVES OF ALKALOIDS OF CHELIDONIUM MAJUS L.

A.Glazev, V.Smirnov, A.Karavay, E. Doroshenko, L.Nefyodov  
*Laboratory of Biochemistry of Biologically Active Substances of  
SIC of Yanka Kupala State University of Grodno, Belarus*

**Summary.** The aim of experimental work was the estimate the mechanisms of anticancer effects of the drug NSC-631570 in regard to its effects on free amino acid contents.

Amino acids and their derivatives were identified by means of the reverse-phase high-performance liquid chromatography with analytical column Diasorb-130 C<sub>16</sub>T (Elsico, Russia) after derivatization with ortho-phthalic aldehyde.

The results obtained enabled us to conclude that one of the probable mechanisms of the cancerostatic effects of thiophosphoric derivatives of alkaloids of *Chelidonium majus L.* was to control the amino acids transport and reactions of their intermediate metabolism.