

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО ПУЛА ПЛАЗМЫ КРОВИ
ПРИ СИСТЕМНЫХ ОПУХОЛЯХ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТИОФОСФОРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ
CHELIODONIUM MAJUS L.**

А.А. Глазев, Смирнов В.Ю, Каравай А.В., Нефёдов Л.И.,

Научно-исследовательская лаборатория биохимии биологически активных веществ

НИС Гродненского государственного университета им. Янки Купалы,

Гродно, Республика Беларусь

Введение

Метаболический контроль и коррекция моделируемых или возникающих естественным путем патологических состояний основаны на наличии адекватных биохимических критериев и их рациональном анализе. Информативность последних во многом определяется не только биологической значимостью, но и уровнем интеграции процессов обмена веществ, отражением которых являются эти показатели.

Указанным требованиям в первую очередь отвечает аминокислотный фонд физиологических жидкостей: достаточно широкий спектр определяемых показателей, взаимосвязанных в стандартных условиях.

Особенности превращений аминокислот в разнообразных типах опухолей исследованы довольно широко и подробно [1] по сравнению с аминокислотным пулом тканей и биологических жидкостей опухоленосителя. Так, показано, что снижение активности специфических ферментов катаболизма аминокислот в злокачественных новообразованиях является причиной использования последними эндогенного фонда аминокислот хозяина для собственного роста, что приводит к возникновению отрицательного азотистого баланса [2]. Важнейшими факторами возникающего вследствие этого аминокислотного дисбаланса, кроме того, являются анорексия и голодание [3,4].

Одновременно, существующие методы терапии злокачественных заболеваний не только не устраняют аминокислотный дисбаланс в организме больного, но чаще всего усугубляют его [5-7].

В целом ряде исследований установлено, что относительная нормализация аминокислотного фонда в организме опухоленосителя является одним из достоверных критериев эффективности проводимого лечения и коррелирует с клиническими показателями [6-8].

Последнее является особенно актуальным с точки зрения исследования механизмов канцеростатического действия применяемых фармакологических средств и поиска путей целенаправленной метаболической коррекции на этапах предоперационной подготовки и послеоперационной реабилитации больных злокачественными новообразованиями [6,8].

Цель: В настоящей работе мы исследовали особенности изменения фонда свободных аминокислот и их производных в плазме крови больных хроническим лимфолейкозом, неходжкинскими лимфомами и миеломной болезнью на фоне применения противоопухолевого иммуномодулятора и цитостатика NSC-631570 – полусинтетического препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.*

Методы исследования

В исследование включены 9 больных с диагностированными системными злокачественными новообразованиями 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

№ групп	Клинический диагноз	Количество больных
1	Здоровые доноры	10
Системные злокачественные новообразования		
2	Хронический лимфолейкоз	2
3	Неходжкинские лимфомы (лимфосаркома)	4
4	Миеломная болезнь	3

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 HClO₄, и центрифугировали в течение 20 мин при 12000g. В качестве внутреннего стандарта использовали гомотаурин ("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 C₁₆ T (6 мкм), размером 3x250 мм (Элсико, Россия) с изократическим элюированием (0,1 М натрий-ацетатный буфер pH 5,71 + CH₃OH 17,5%) при скорости потока 0,6 мл/мин, температуре 30°C после предколоночной 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 тиофосфорных производных *Chelidonium majus L.* при различных локализациях рака), свойства которой в значительной степени определяются взаимосвязями между перечисленными параметрами, и при помощи числовых значений охарактеризовать её многомерными законами распределения [9].

Основными задачами применяемого нами многокомпонентного анализа были:

- 1) выявление скрытых, объективно существующих закономерностей в концентрациях аминокислот в плазме крови при различных локализациях опухолей в зависимости от добавленной концентрации препарата;

2) описание этих закономерностей меньшим, чем число первоначально исследованных соединений, количеством главных компонент;

3) выявление стохастической связи уровня исследованных соединений с главными переменными.

Корреляционный анализ концентраций определяемых соединений позволил количественно определить взаимозависимость изменения уровня исследуемых показателей, определение которых информативно для оценки ситуации злокачественного роста. Сравнение возникающих "нетрадиционных" связей между содержанием аминокислот и их производных позволило определить зависимость изменений их уровней при различных локализациях раковой болезни.

Результаты и обсуждение

В сравнении со здоровыми донорами в плазме крови больных системными злокачественными новообразованиями наблюдается селективное действие тиофосфорных производных алкалоидов на формирование аминокислотного пула плазмы крови. Препарат на основе производных алкалоидов *Chelidonium majus L.* изменяет концентрацию α -аминокислот с положительно заряженными (гистидин, аргинин) или незаряженными полярными (тирозин, треонин) радикальными группами (табл.2).

В зависимости от локализации опухоли (хронический лимфолейкоз, неходжкинские лимфомы (лимфосаркома), миеломная болезнь) значимые изменения при инкубации цельной крови с препаратом на основе тиофосфорных производных алкалоидов наблюдались в уровне тирозина. Кроме того, изменения, индуцированные добавлением препарата, зарегистрированы и в уровне таурина (при миеломной болезни) (табл.2).

Таблица 2

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

Аминокислоты	Здоровый контроль	Хронический лимфолейкоз	Неходжкинская лимфома	Миеломная болезнь
Gln	317,40 ± 53,34	371,83 ± 56,90	324,57 ± 56,84	241,57 ± 79,11
His	81,78 ± 2,99	49,22 ± 5,62*	46,990 ± 6,088*†	51,26 ± 10,93*
Thr	130,35 ± 11,39	94,60 ± 11,69	89,23 ± 12,74	98,82 ± 11,18
PEA	22,30 ± 2,25	12,59 ± 4,75	8,16 ± 1,52*†	9,55 ± 2,31*

Arg	20,76 ± 2,90	25,68 ± 2,24	38,42 ± 5,37*	47,80 ± 7,56*
Tau	133,76 ± 18,92	74,65 ± 10,41	95,62 ± 19,95	89,69 ± 4,22
bAla	8,57 ± 3,76	5,82 ± 2,52	5,978 ± 1,072	7,587 ± 2,031
Ala	214,72 ± 14,97	163,31 ± 45,91	183,78 ± 23,44	161,97 ± 7,71
Tyr	175,475 ± 7,924	105,050 ± 21,035*†	97,77 ± 6,16*†	121,20 ± 7,62*

* – $p < 0,05$ 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;

Также нами анализировались корреляционные связи между уровнями исследованных аминокислот и добавленной концентрацией препарата NSC-631570. При этом в плазме крови здоровых доноров между концентрацией алкалоидов и уровнями производных аминокислот — фосфоэтаноламина и β -аланина (табл. 3) нами отмечены достоверные корреляции.

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	2	4
Asp	0,08	-0,22	0,04	-0,08
Asn	-0,08	0,20	-0,06	-0,36
Glu	-0,11	-0,15	0,00	0,11
Ser	0,04	-0,15	0,05	-0,19
Gln	0,11	0,34	0,01	-0,24
His	0,13	-0,10	0,38	0,07
Gly	0,10	-0,47	-0,06	0,01
Thr	-0,09	0,07	0,21	-0,28
PEA	0,29*	0,05	0,14	-0,05
Arg	0,00	0,05	0,08	-0,22
Tau	0,21	-0,10	0,03	0,23
bAla	0,38*	0,25	-0,17	0,05

Ala	-0,11	0,20	-0,02	-0,32
Tyr	0,73*	0,47	0,82*	0,70*

С целью выявления эффектов препарата NSC-631570, общих для всех исследованных опухолевых процессов, на уровне определяемых нами соединений был проведен дискриминантный анализ, который доказал, что препарат оказывает наиболее выраженное действие на пул свободных аминокислот плазмы крови больных при добавлении его в концентрации 20 мкг/мл.

Характер действия препарата зависит от локализации опухолевого процесса и его добавленной концентрации. Эффекты на исследованные показатели проявляется при концентрациях препарата больших, чем возможные терапевтические. Последнее не ограничивает, а предполагает применение препарата *in vitro* (цельная кровь) для ранней диагностики раковой болезни. Очевидно, что наиболее чувствительным к действию тиофосфорных производных *Chelidonium majus L.* показателем *in vitro* при опухолях данных локализаций является сниженная концентрация тирозина.

Примечательно, что полярность инкубационной среды изменяет спектры флуоресценции в исследованиях взаимодействия тиофосфорных производных алкалоидов чистотела с реконструированным *in vitro* фосфолипидным бислоем клеточной мембраны и при $\lambda_{\text{возб}}=350$ нм вызывает исчезновение зарегистрированного в нейтральных растворах пика флуоресценции препарата в области 600 нм, а при $\lambda_{\text{возб}}=410$ нм - практически шестикратное увеличение интенсивности пика флуоресценции в области 450 нм [10].

Практически важным является то, что в исследованиях спектров флуоресценции плазмы крови, зарегистрированных нами при внесении препарата NSC-631570 в цельную кровь больных хроническим лимфолейкозом (рис. 1) по сравнению с практически здоровыми донорами получены результаты, удовлетворительно объясняемые с позиций взаимодействия компонентов препарата с биомолекулами, присутствующими только в плазме крови раковых больных.

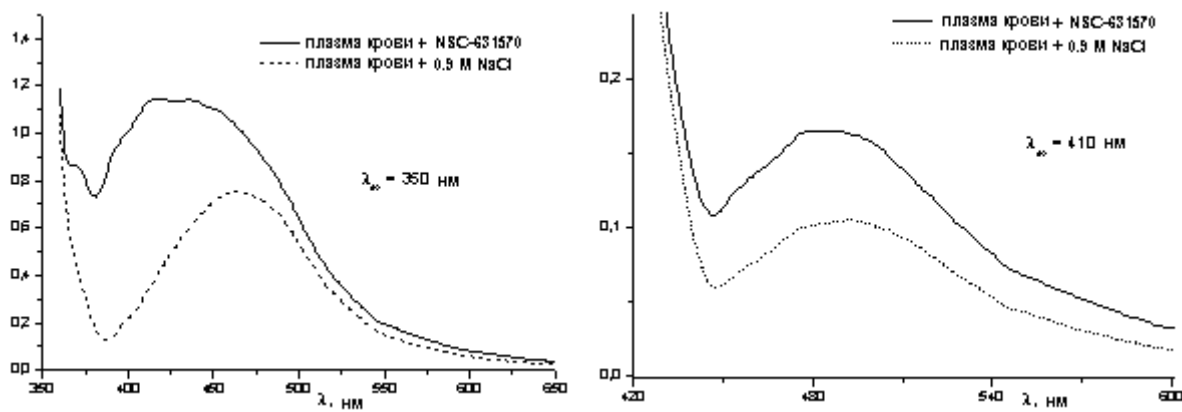


Рис. 1. Спектры флуоресценции плазмы крови больных хроническим лимфолейкозом после инкубации цельной крови с раствором препарата NSC-631570 и изотоническим раствором NaCl (при $\lambda_{\text{возб.}}$ = 350 и 410 нм).

Полученные результаты по исследованию закономерностей формирования аминокислотного фонда в плазме крови при злокачественных новообразованиях различной локализации позволяют в целом предположить вероятный механизм канцеростатического действия препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого – изменение концентраций свободных аминокислот опосредовано, через влияние алкалоидов чистотела и их производных на регуляцию процессов формирования аминокислотного фонда. Известно, что аминокислотный фонд плазмы представлен пулом свободных и аминокислот, лабильно связанных с белками крови [11], состав и свойства которых, включая маркерные и другие синтезируемые раковыми клетками белки, изначально различны у здоровых и онкологических больных.

Исследуемый препарат, по нашему мнению, изменяет связывающую способность или степень сродства специфических белков к свободным аминокислотам вследствие изменения пространственной конформации этих белков, посттрансляционной модификации или за счёт гидролиза структурных и функциональных протеинов раковых клеток.

Тем самым, изменяется характер распределения аминокислот между двумя существующими пулами аминокислот плазмы крови.

Полученные нами доказательства различного действия препарата NSC-631570 на уровни свободных L-аминокислот в плазме крови практически здоровых доноров и онкологических больных *in vitro* в зависимости от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации препарата, позволяют предположить влияние тиофосфорных производных алкалоидов *Chelidonium majus L.* на канцерогенез и дают основание для дальнейших исследований в направлении их применения для диагностики раковой болезни.

Список литературы:

1. Березов, Т.Т. Обмен аминокислот нормальных тканей и злокачественных опухолей / Т.Т. Березов. – М.: Медицина, 1969. – 224с.
2. Березов, Т.Т. Метаболизм аминокислот и полиаминов в злокачественных опухолях / Т.Т. Березов // Лаб. дело. – 1982. – №5. – С. 36-38.
3. Западнюк, В.И. Аминокислоты в медицине / В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.С. Заика. – Киев, Здоров'я, 1982. – 200с.
4. Малиновский, Н.Н. Изменение аминокрамм сыворотки крови и мочи в послеоперационном периоде у больных раком желудка под влиянием аминокислотных растворов / Н.Н. Малиновский [и др] // Актуальн. вопр. клинич. и эксперим. мед. – 1980. – С. 41-43.
5. Нефёдов, Л.И. Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса: автореф. ... дис. докт. мед. наук: 03.00.04 / Л.И. Нефёдов; Белорус. гос. ун-т. – Минск, 1993. – 34с.
6. Blackburn, G.L. Amino Acid Metabolism and medical applications / G.L. Blackburn, J.P. Grant, V.R. Yoring. – London, J. Wright Inc., 1983. – 520 p.
7. Erikson, L.S. Splanchnic metabolism of amino acids in healthy subjects: effect of 60 hours of fasting / L.S. Erikson [et al] // Metabolism. – 1988. – Vol. 37, № 12. – P. 1159–1162.
8. Hirayama, C. Plasma amino acid patterns in hepatocellular carcinoma / C. Hirayama [et al] // Biochem. Med. and Metabol. Biol. – 1987. - Vol. 38. – P. 127–133.
9. 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.
10. Маскевич, А.А. Спектральные свойства препарата Ukrain и его основных алкалоидов при взаимодействии с липосомами / А.А. Маскевич, В.Ю. Смирнов, Я. Новицкий // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем, VII съезд БООФИБ: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 21-23 июня

2006 г.: сб. статей в 2 т. / редкол.: И.Д. Волотовский [и др]. – Минск, 2006. – Т. 1. – С. 287–292.

11. Пикулев, А.Т. Влияние ионизирующего излучения в относительно небольшой дозе на обмен глутаминовой кислоты в животном организме: автореф. ... дис. д-ра биол. наук: 03.00.04 / А.Т. Пикулев; Белорус. гос. ун-т. – Минск, 1969. – 41с.

CHARACTERISTICS OF CHANGES OF THE AMINO ACID POOL OF PLASMA BLOOD
IN SYSTEMATIC TUMORS UNDER INFLUENCE OF THIOPHOSPHORIC DERIVATIVES
OF ALKALOIDS OF CHELIDONIUM MAJUS L.

A. Glazev, V. Smirnov, A. Karavay, L. Nefyodov

*Laboratory of Biochemistry of Biologically Active Substances of
SIC of Yanka Kupala State University of Grodno, Belarus*

Summary. The aim of this work was elucidation of the mechanisms of the anticancer effect of NSC-631570 by comparing the processes of formation of the pool of free amino acids and their derivatives in the blood plasma in patients with lymphatic leukemia, lymphosarcoma, multiple (plasma cell) myeloma.

Amino acids and their derivatives were identified by means of the reverse-phase high-performance liquid chromatography with analytical column Diasorb-130 C₁₆T (Elsico, Russia) after derivatization with ortho-phthalic aldehyde.

The studies of the pool of blood plasma amino acids and their derivatives showed that thiophosphoric derivatives of alkaloids of *Chelidonium majus L.* in plasma of cancer patients affects amino acids with positively charged (His, Arg) or not charged (Tyr, Thr) radical groups. These changes depend on the concentration of NSC-631570 and the type of cancer.