

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈՂԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

**ԹԱԴԵՎՈՍՅԱՆ ԼԻԼԻՅԱ ՀԱՄԼԵՏԻ**

**ՆՅՈՒԹԱՓՈՒՄԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԽԱՆԳԱՐՄԱՆ ՈՐՈՇ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑԻԿԼՈՖՈՍՖԱՄԻԴՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ  
ԱԳՐԱՆՈՒԼՈՑԻՏՈՋԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների  
թեկնածուի զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2014

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

**ТАДЕВОСЯН ЛИЛИЯ ГАМЛЕТОВНА**

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ  
ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННОМ АГРАНУЛОЦИТОЗЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.00.04-«Биохимия»

ЕРЕВАН – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ն. Խ. Բունիայանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտում

Գիտական ղեկավար՝

Կ.գ.դ., պրոֆ. Մ. Ա. Միմոնյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.գ.դ., պրոֆ. Պ.Ա. Ղազարյան  
Կ.գ.դ., պրոֆ. Ս.Պ. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Մ. Հերացու անվան Երևանի պետական  
բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. հունիսի 4-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք. Երևան, Հասարակության փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և [www.molbiol.sci.am](http://www.molbiol.sci.am) կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2014թ. հունիսի 4-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական  
քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու

Գ.Ս.Մկրտչյան

---

Тема диссертации утверждена в Институте биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

Научный руководитель:

д.б.н., проф. М. А. Симонян

Официальные оппоненты:

д.б.н., проф. П.А. Казарян  
д.б.н., проф. С.П. Оганесян

Ведущая организация:

Ереванский государственный медицинский  
университет им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 4 июля 2014г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте [www.molbiol.sci.am](http://www.molbiol.sci.am).

Автореферат разослан 4 июня 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук

Г.М. Мкртчян

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** На современном этапе развития медицины приоритетными задачами практической онкологии являются поиск и разработка принципиально новых методических подходов, а также усовершенствование традиционных способов противоопухолевой химиотерапии с целью повышения эффективности лечения злокачественных опухолей. В число широко применяемых препаратов входят доксорубицин (ДР) и циклофосфамид (ЦФ) [Кауфман М. и др., 2008]. Помимо терапевтического влияния, эти противоопухолевые препараты имеют также ряд побочных эффектов обусловленных низкой избирательностью действия, главными из которых являются потенциально необратимая, кумулятивная и дозозависимая кардиотоксичность, нефротоксичность, нейротоксичность, гематотоксичность, бесплодие и поражение мочевого пузыря [Кауфман М. и др., 2008; Colvin O.M., 1999; Ludeman S.M. 1999]. Известно, что ЦФ и ДР разрушают как больные, так и здоровые быстрорегенерирующие клетки. Прежде всего, это клетки крови, что в результате приводит к почти полной цитопении. Имея выраженное миелотоксическое действие, ЦФ может разрушить гранулоциты в периферической крови до состояния агранулоцитоза. Агранулоцитоз - это клинико-гематологический синдром, который характеризуется лейкопенией и уменьшением количества гранулоцитов в периферической крови, вплоть до их полного отсутствия. Развитие гематотоксических последствий в значительной мере зависит от интенсивности образования супероксидных радикалов ( $O_2^-$ ) и их производных. Ключевыми системами продуцирования  $O_2^-$  являются изоформы NADPH-оксидазы – Nox (или цитохромы  $b_{558}$ ) различной локализации [Batot G. et al., 1998; Campion Y. et al., 2009; Fuhler G. et al., 2003; Kalinina N. et al., 2002; Vignais P.V., 2002].

Отсутствие избирательности действия цитостатических препаратов обуславливает необходимость разработки протективных и регенераторных технологий, снижающих негативные эффекты этих веществ и способствующих развитию тканеспецифических регенераторных реакций в органах и тканях, которые не поражены неопластическим процессом.

Исходя из того, что ЦФ и ДР являются важными агентами противоопухолевой химиотерапии, крайне необходимым представляется поиск биоактивных средств с антиопухолевой и антистрессорной активностью, которые при совместном применении могут снизить побочные эффекты этих лекарств. Для экспериментов в качестве такого агента мы использовали галармин. Следует также иметь в виду, что в настоящее время еще не определены молекулярно-биохимические механизмы воздействия ЦФ и ДР на уровень и активность ключевых металлопротеинов (МП) с антиоксидантной активностью (МАО) и металлопротеинов с прооксидантной активностью (МПО), регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК), в эксперименте и клинике.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось изучение молекулярно-биохимических последствий воздействия ЦФ и ДР на уровень и активность МПО и МАО тканей (селезенка, печень, почки, костный мозг, кровь) крыс в отсутствии и

присутствии галармина *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* при острой интоксикации ЦФ и ДР, а также в крови пациенток со злокачественной опухолью молочной железы после курса химиотерапии при агранулоцитозе.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучение количественных и качественных изменений МПА и МАА в клетках тканей (кровь, печень, почки, сердце, селезенка, костный мозг) интактных крыс – самок и самцов.
2. Определение характерных качественных и количественных изменений МАА и МПА тканей крыс под влиянием ЦФ и ДР *in vitro* и *ex vivo*.
3. Определение уровня и активности МАА и МПА тканей крыс под влиянием внутривнутрибрюшинно введенных ДР и галармина в лечебном режиме.
4. Определение уровня и активности МАА и МПА тканей крыс под влиянием внутривнутрибрюшинно введенных ЦФ и галармина в лечебном режиме.
5. Определение качественных и количественных изменений МАА и МПА со злокачественной опухолью молочной железы при агранулоцитозе.

#### **Научная новизна работы.**

1. Изменение исследуемых характеристик МАА, NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox из клеточных формирований зависит от пола крыс: в частности, толерантность к АФК более ощутима у самок, по сравнению с самцами.
2. В результате четырехдневного аэробного инкубирования крови крыс с ЦФ при 4°C прооксидантная толерантность сыворотки у самок выше, по сравнению с самцами. При этом прооксидантная толерантность ЭМ у самок меньше, а стабильность эритроцитов у них уступает аналогичному показателю у самцов, хотя антиоксидантная толерантность крови у самок в большинстве случаев ниже, чем у самцов.
3. Под влиянием ЦФ *ex vivo* и *in vivo* происходят изменения уровня и активности МАА и МПА тканей крыс различной степени; внутривнутрибрюшинно введенный галармин в большинстве случаев приближает эти показатели к норме.
4. В условиях аэробной инкубации ДР (0,03 мг/мл) с МАА и МПА из клеточных компонентов тканей крыс *in vitro* повреждающее действие ДР связано с необратимыми структурно-функциональными нарушениями, в первую очередь, мембранных изоформ Nox. При этом наблюдается некоторое повышение NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox из ЭМ и мембран клеток селезенки (МКС) крыс с одновременным снижением активности Cu,Zn-СОД каталазы и  $O_2^-$ -продуцирующей активности супрола, хотя NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность экстрацеллюлярного Nox (eNox) практически не изменяются.

5. При острой интоксикации крыс ЦФ прооксидантный статус, по сравнению с антиоксидантным, повышается в сыворотке, эритроцитах, печени и клетках селезенки. Однако NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая и ферриНв-восстанавливающая активность Nox из эритроцитарных мембран и МКС существенно снижается. Такое стрессорное состояние животных отражается и на степени их выживаемости, достигающей 65-70%.
6. Внутривенно введенный ДР вызывает резкое нарушение физиологического равновесия между МАА и МПА посредством увеличения уровня NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей активности Nox и снижения активности МАА в эритроцитах, клетках костного мозга и селезенки. Эти изменения ассоциируются с заметным ростом уровня eNox сыворотки.
7. Толерантность МАА и МПА клеток почек и сердца к ДР выражена в различной степени, а галармин в целом оказывает регулирующее воздействие на уровень и активность этих МП.
8. В результате комбинированной терапии ЦФ и ДР активность ключевых антиоксидантных ферментов Cu,Zn-СОД и каталазы в крови больных при агранулоцитозе (АГ) приближается к норме, однако уровень и активность прооксидантных металлопротеинов (Nox и eNox) изменяются различным образом: снижение содержания Nox в ЭМ компенсируется его повышением для eNox сыворотки крови, регулируя тем самым прооксидантный статус крови пациентов с АГ.

#### **Научно-практическое значение работы.**

1. Характерные количественные и качественные изменения МАА и МПА в клеточных формированиях крыс под влиянием ЦФ и ДР *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* являются новыми молекулярно-биохимическими последствиями оксидативного повреждения клеток животных.
2. Установлены эффективные дозы ДР и ЦФ, изменяющие оптико-спектральные характеристики и активность МАА и МПА, что необходимо учитывать при использовании данных лекарств в клинической практике.
3. Степень сближения показателей уровня и активности МАА и МПА в эритроцитах и сыворотке крови больных при АГ в условиях комплексного лечения ЦФ и ДР является новым маркером оценки эффективности терапии.
4. Галармин, как натуральный препарат с противоопухолевой и антирадикальной активностью, может быть рекомендован для совместной с ЦФ и ДР терапии у больных со злокачественной опухолью молочной железы.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано девять статей и два тезиса.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, использованных методов, результатов собственных исследований,

заклучения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа представлена на 105 страницах, содержит 32 рисунка и 12 таблиц. Библиографический указатель включает 171 наименование литературных источников.

**Содержание диссертации.** Во введении обоснованы актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, отмечена научная новизна, а также теоретическая и практическая ценность полученных результатов.

**В главе 1** рукописи изложен обзор литературных данных о NADPH-оксидазах (Nox), их роли и молекулярно-биохимических механизмах воздействия, побочных эффектов циклофосамида и доксорубина при агранулоцитозе, противоопухолевых и анитистрессорных свойствах галармина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением была группа женщин (6 больных) в возрасте 25-50 лет (средний возраст  $33 \pm 8,6$  лет) с диагнозом “мультицентрический рак молочной железы” в стадии T2-4(m)N<sub>0</sub>2MOG3NR. Всем пациенткам был назначен неоадьювантный курс химиотерапии (ХТ) по схеме AC6 (циклофосамид в дозе 600 мг/м<sup>2</sup>, доксорубин 60 мг/м<sup>2</sup>) один раз в три недели, максимум шесть курсов. В экспериментальных исследованиях определяли влияние ЦФ (40 мг/кг) и ДР (3 мг/кг) на белых половозрелых крысах (массой 220-250 г) *in vivo*, а также действие этих препаратов на изоформы Nox *ex vivo* и *in vitro*. МАА (Cu, Zn-СОД и каталазы) и МПА (изоформы Nox из клеток тканей крыс, цитохром b5 из цитозоля эритроцитов, супрол и экстрацеллюлярный Nox из сыворотки крови) получали методами М.А.Симоняна и соавт. с применением ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52 и КМ-52, а также гель-фильтрации на сефадексах различной марки (G-100 и др). СОД активность фракций, а также NADPH-зависимую O<sub>2</sub><sup>-</sup>- продуцирующую активность фракций изоформ Nox определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, измеряя плотность максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), который образуется в результате восстановления НТС супероксидными радикалами O<sub>2</sub><sup>-</sup>-. За единицу СОД активности принимали количество фракций, ингибирующих на 50% образование формазана. За единицу NADPH-зависимой O<sub>2</sub><sup>-</sup>-продуцирующей активности NADPH-оксидаз из крови, костного мозга и селезенки принимали количество фракций, которое вызывает увеличение уровня (плотность поглощения при 560 нм) формазана на 50%. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в отсутствии и присутствии фракций каталазы. За единицу каталазной активности принимали количество белка, вызывающего расщепление 0.1 М H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за 1 мин при 20<sup>0</sup>С. Удельная активность белковых фракций была определена в расчете на 1мл эритроцитов или 1 г ткани с объемом фракции 1мл. Ферригемоглобин (ферриHb)-восстанавливающую активность определяли измерением степени снижения плотности максимального

оптического поглощения ферриHb (при 565 нм). Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb ( $\text{Fe}^{2+}$ -Hb) при 555 нм. При этом к 3 мл раствора ферриHb крыс (с  $A_{565} = 0.8$ :  $\alpha$ -поглощение ферриHb) добавляли 0.1 мл изоформы цит  $b_{558}$  с  $A_{530}^0 = 0.3$ . После суточного инкубирования при 36°C (без перемешивания раствора) наблюдается образование ферроHb. За единицу ферриHb-восстанавливающей активности принимали количество фракций NADPH-оксидазы, которое вызывает снижение плотности  $\alpha$ -поглощения ферриHb до 0.05, в течение часа. Количество МП определяли оптическим спектральным методом, измеряя плотность характерного максимального оптического поглощения для цит  $b_5$  при 525 нм, для изоформ Nox – 530 нм, для супрола – 430 нм, для церулоплазмينا – 610 нм, для трансферрина – 470 нм и для цитохрома С – 520 нм. В ходе работ были применены спектрофотометр «Specord UV/VIS» (Германия) и ЭПР «Varian E-9» (США). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли стандартными методами вариационной статистики с определением степени статистической достоверности  $P$  вычисленных критериев (Стьюдента и Фишера).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Изменение уровня и активности МАА и МПА в клеточных формированиях тканей крыс по половым признакам.** Фракции изоформ Nox, полученные из клеточных формирований селезенки, печени, сердца, почек и мозговой ткани самок и самцов, практически не отличаются по оптическим спектральным показателям и характерным максимумам поглощений (рис. 1). Например, во фракциях Nox из клеточных формирований селезенки после восстановления этих гемопroteинов дитионитом натрия оптические спектры поглощения по форме и по максимумам поглощений (поглощение при 558 нм) соответствуют аналогичным показателям цит  $b_{558}$  из других биообъектов.

По рассматриваемым оптико-спектральным показателям исследованные фракции Nox практически не отличаются у самок и самцов. Вместе с тем их уровень в ядрах, митохондриях и мембранах клеток (МК) в тканях у самок и самцов изменяется различным образом. По сравнению со 100%-ми показателями у самцов, у самок удельное содержание Nox (расчетное количество белка, полученного из 1 г ткани, объемом 1 мл) не изменяется в ядрах клеток печени и почек, но снижается в ядрах клеток мозговой ткани и повышается в ядерных фракциях селезенки и сердца. В митохондриях удельное содержание Nox снижается в клетках печени, почек и сердца и несколько повышается в ядрах клеток мозга и селезенки (на 28-47%). Уровень Nox снижается только в клеточных формированиях почек, не изменяется в МК печени и сердца, но повышается в МК мозговой ткани и селезенки. По сравнению со 100%-ми показателями у самцов, у самок NADPH-зависимая супероксид-продуцирующая активность снижается во фракциях Nox из ядер клеток почек, печени, мозга и повышается в ядерных клетках сердца и селезенки (на 15-51%). Эта активность снижается только во фракциях Nox из митохондрий клеток почек, а из митохондрий остальных тканей, особенно из селезенки, NADPH-зависимая

супероксид-продуцирующая активность повышается. NADPH-зависимая супероксид-продуцирующая активность Nox повышается (на 21-33%) в МК селезенки и мозга, не изменяется в МК печени и снижается в МК почек и сердца (на 32-38%).

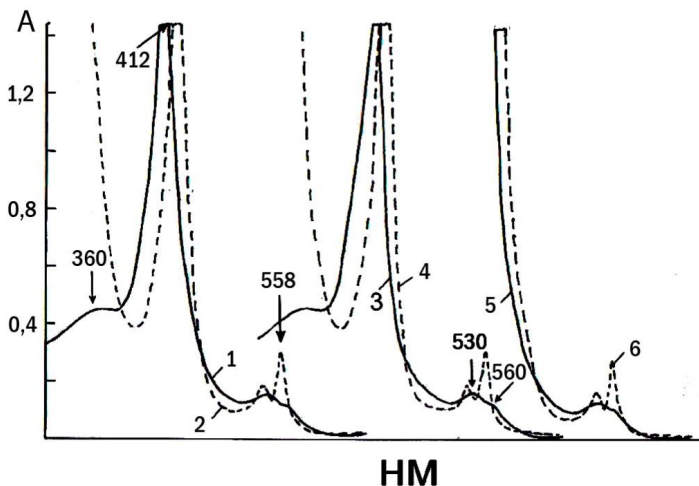


Рис. 1. Оптические спектры поглощения фракций цит  $b_{558}$  кислого характера из клеточных формирований селезенки самцов: из мембран клеток (1) и после его восстановления дитионитом натрия (2), из ядер клеток (3) и после его восстановления (4), из митохондрий (5) и после его восстановления (6). У самок эти показатели практически совпадают. Цитохромы  $b_{558}$  растворены в 0,1 М КФБ.

По сравнению с показателями у самцов, у самок ферриHb-восстанавливающая активность не изменяется во фракциях Nox из ядер сердца и мозга и повышается во фракциях из ядер почек и селезенки. Эта активность увеличивается во фракциях Nox из митохондрий клеток почек, сердца и селезенки и практически не изменяется во фракциях Nox из митохондрий печени и мозга. В МК рассматриваемых тканей данная активность практически не меняется в клетках почек, сердца и мозга, но резко повышается в митохондриях клеток селезенки и заметно снижается в МК печени самок (рис. 2).

По сравнению с самками, суммарная активность антиоксидантных ферментов СОД-1 и СОД-2 у самцов повышается в цитозоле клеток печени, селезенки, почек и, особенно, в клетках сердца и мозга. Низкая каталазная активность наблюдается в цитозоле клеток мозговой ткани. Этот показатель не изменяется в тканях сердца и почек, но повышается в клетках печени и, заметнее всего, в цитозоле клеток селезенки у самок.



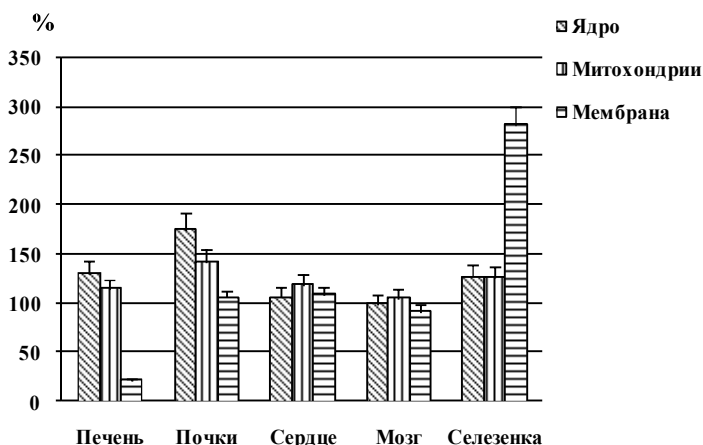


Рис. 2. Относительное изменение (%) ферриHb-восстанавливающей активности Nox из клеточных формирований тканей у самок, по сравнению со 100%-ми показателями у самцов ( $P < 0,05$ ).

Таким образом, активность ключевых антиоксидантных ферментов в цитозоле клеток рассматриваемых тканей изменяется по-разному. Полученные результаты являются обнаруженными нами дополнительными факторами полозависимого отличия метаболизма АФК.

**2. Различия в толерантности МП анти- и прооксидантной активности крови крыс после аэробного инкубирования крови с ЦФ.** Четырехдневное аэробное инкубирование крови в отсутствие и присутствии ЦФ вызывает неадекватные изменения в уровне и активности МПА и МАА в крови крыс (самок и самцов). ЦФ (в концентрации 3,3 мг/мл) обуславливает снижение уровня суммарной фракции сывороточных Nox (eNox) крови у самцов в большей степени, чем у самок. Возможно, таким образом проявляется иммуносупрессорный эффект ЦФ. Подобная закономерность наблюдается и для цитохрома  $b_5$  из цитоплазмы эритроцитов, а также для Nox ЭМ; более того, у самок уровень последнего показателя несколько повышается по сравнению с контролем (в отсутствие ЦФ). ЦФ вызывает также снижение уровня супрола у самцов, по сравнению с самками (рис. 3). ЦФ в рассматриваемых условиях способствует повышению  $O_2^-$ -продуцирующей активности супрола крови у самок и самцов в одинаковых диапазонах. В аналогичных условиях ЦФ способствует росту NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ eNox крыс у самок намного больше, чем у

самцов. Однако снижение уровня сывороточных Nox компенсируется повышением их NADPH зависимой O<sub>2</sub><sup>-</sup>-продуцирующей активности.

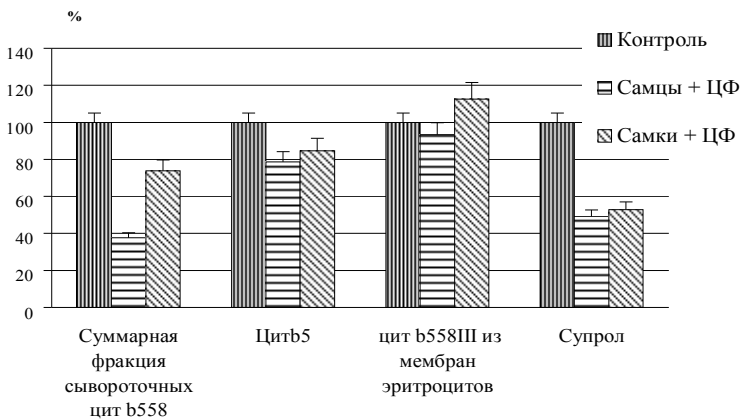


Рис.3. Относительные изменения (%) уровня МПА сыровотки крови и ЭМ у самок и самцов после 4-дневной инкубации крови в аэробных условиях при 4°C с 3.3 мг/мл ЦФ, по сравнению со 100%-ми контрольными показателями (полученные в отсутствии ЦФ), P < 0.05, n=6.

По сравнению со 100%-ми показателями у самцов, инкубирование крови самок в рассматриваемых условиях вызывает снижение NADPH-зависимой O<sub>2</sub><sup>-</sup>-продуцирующей активности Nox ЭМ у самок, особенно в присутствии ЦФ. Однако в этих условиях ферриHb-восстанавливающая активность Nox ЭМ у самок несколько выше аналогичного показателя у самцов, хотя под влиянием ЦФ происходит заметное снижение этой характеристики.

Таким образом, в результате аэробного инкубирования крови крыс с ЦФ в наблюдаемых условиях прооксидантная толерантность сыровотки (изменение уровня NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ eNox, а также супурола под влиянием ЦФ) у самок выше аналогического показателя у самцов. В то же время прооксидантная толерантность ЭМ у самок меньше, по сравнению с самцами. Это свидетельствует о том, что стабильность эритроцитов у самок уступает таковой у самцов после аэробного инкубирования крови с ЦФ.

Четырехдневное аэробное инкубирование ЦФ с кровью самок и самцов приводит к незакономерному снижению уровня и активности МАА. Активность Cu,Zn-СОД в цитоплазме эритроцитов у самцов и самок снижается почти в одинаковых диапазонах, однако каталазная активность у самок падает сильнее. На этом фоне снижение уровня трансферрина у самок еще заметнее. В этих условиях уменьшение содержания церулоплазмينا в сыворотке крови самок превышает таковое у самцов (рис.4).

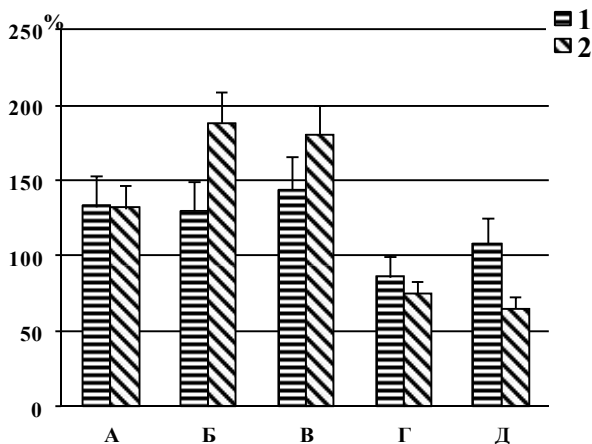


Рис. 4. Относительное изменение (%)  $O_2^-$ -продуцирующей активности супрола (А), метНб-восстанавливающей (Б) и NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей (В) активности суммарной фракции изоформ цит  $b_{558}I + \text{цит } b_{558}II$  сыворотки крови, NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей (Г) и метНб-восстанавливающей (Д) активностей цит  $b_{558}III$  ЭМ самок, по сравнению со 100 % показателями самцов в отсутствии (1) и присутствии (2) ЦФ,  $P < 0.05$ ,  $n = 6$ .

В целом, полученные данные свидетельствует о том, что стабильность эритроцитов у 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) у самок в большинстве случаев ниже, чем у самцов.

### 3. Влияние ЦФ на активность анти- и прооксидантных МП тканей крыс *ex vivo*

Инкубирование ЦФ с гомогенатами тканей и кровью вызывает неадекватные изменения суммарного уровня МПА-изоформ Nox, полученных из мембран клеток (МК) этих тканей. На фоне увеличения уровня суммарной фракции Nox МК эритроцитов,

печени и мозга в костном мозгу и в сыворотке крови содержание этих гемопротеинов практически не изменяется (табл. 1), но заметно снижается в МК селезенки, сердца и почек. При этом в сыворотке крови наблюдается снижение уровня другого МПА – супрола.

Таблица 1.

Относительные изменения (%) уровня НАДРН-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и метНб-восстанавливающей активности суммарной фракции изоформ цит  $b_{558}$  из ЭМ и МК тканей после 48 ч инкубирования крови и гомогенатов тканей крыс с 10 мг/мл ЦФ *ex vivo*, по сравнению со 100%-ми контрольными показателями (в отсутствии ЦФ),  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

Суммарная фракция изоформ цит $b_{558}$ из тканей	Уровень	НАДРН-зависимая	
		$O_2^-$ -продуцирующая активность	Мет Нб-восстанавливающая активность
Сыворотка	+ 4,7 ± 0,3	- 23,4 ± 2,5 (P < 0,001)	- 34,6 ± 5,9
ЭМ	+ 57,3 ± 6,1 (P < 0,01)	- 44,3 ± 5,1	- 60,5 ± 7,5 (P < 0,03)
Селезенка	- 52,1 ± 4,7	- 56,9 ± 5,7 (P < 0,03)	- 44,6 ± 7,7
Костный мозг	- 5,1 ± 0,2	- 7,1 ± 0,6	- 3,7 ± 0,4
Мозг	+ 42,6 ± 4,1 (P < 0,001)	+ 65,4 ± 7,1 (P < 0,01)	+ 15,1 ± 2,2
Печень	+ 22,3 ± 2,4	+ 77,2 ± 6,5	+ 28,3 ± 5,1 (P < 0,01)
Почки	- 37,5 ± 4,7 (P < 0,03)	+ 51,1 ± 4,7 (P < 0,001)	- 11,3 ± 1,4
Сердце	+ 24,1 ± 3,3	+ 4,6 ± 0,2	+ 29,2 ± 4,3 (P < 0,001)
Супрол из сыворотки	- 35,0 ± 4,8	+ 15,1 ± 2,4	-

Эти результаты свидетельствуют о том, что при аэробном инкубировании ЦФ с гомогенатами тканей последние проявляют разнонаправленную резистентность против ЦФ. Содержание другого МПА, цит С, в тканях в подавляющем большинстве снижается под влиянием ЦФ *ex vivo* и только в почечной ткани наблюдается повышение уровня этого гемопротейна. В рассматриваемых условиях ЦФ вызывает рост  $O_2^-$ -продуцирующей активности суммарной фракции Nox из МК печени, мозга, селезенки и почек, но почти не аналогичную характеристику суммарной фракции Nox из МК костного мозга и сердца (табл. 1). Следует добавить, что ферриHb-восстанавливающая активность Nox ЭМ и МК других тканей также подвергается изменению.

Таким образом, под воздействием ЦФ *ex vivo* активность ключевых МАА (Cu,Zn-СОД, Mn-СОД, каталазы и церулоплазмينا) в рассматриваемых биосистемах проявляет тенденцию к снижению (с повышением уровня трансферрина). Под влиянием ЦФ *ex vivo* происходит накопление в различной степени перекиси водорода (соответственно, гидроксильных радикалов) в гомогенатах тканей (что, в первую очередь, зависит от величины каталазной активности в тканях). При этом наблюдается изменение уровня и активности МАА, и МПА различного диапазона.

#### **4. Резкое повышение прооксидантного статуса тканей крыс при острой интоксикации ЦФ.**

Существенное увеличение уровня сывороточных Nox обусловлено действием адаптационных систем крови против перекиси водорода (эти гемопротейны обладают некоторой *каталазамиметической активностью*). Снижение содержания фракции Nox ЭМ, скорее всего, обусловлено увеличением степени агрегации данных гемопротейнов, осложняющим процесс их отщепления.

Исходя из этого допущения, можно предположить, что степень агрегации Nox в мембранах клеток селезенки (МКС) снижена (из-за чего повышается уровень отщепленной из гетерогенной фазы в гомогенную фазу фракции Nox).

Фактор агрегации этих гемопротейнов в гетерогенной фазе (или снижение текучести ЭМ) действует и на NADPH-зависимую  $O_2^-$ -продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активность изоформ Nox, которая снижена в ЭМ, но увеличена в гомогенной фазе.

С другой стороны, заметное снижение уровня NADPH-содержащего  $O_2^-$ -продуцирующего липопротейна сыворотки – супрола (его  $O_2^-$ -продуцирующая активность не изменяется) считается положительным фактором, так как при этом сохраняется вязкость сыворотки и в целом микроциркуляция крови. Под влиянием ЦФ заметно снижается уровень сывороточного церулоплазмينا (при этом содержание трансферрина слегка снижено).

В данных условиях уровень отщепленного цит С из митохондрий печени существенно увеличен, тогда как этот процесс в селезенке подавлен. Активность Cu,Zn-

СОД в цитозоле эритроцитов и суммарная Cu,Zn-СОД и Мп-СОД активность цитозоля печени и селезенки не изменяются, однако активность каталазы в печени существенно снижена под влиянием ЦФ. Суммарный уровень МАА и МПА (включая и цит С) или АС и ПС подвергается характерным изменениям при острой интоксикации крыс ЦФ. По сравнению с антиоксидантным статусом (АС), прооксидантный статус (ПС) повышен заметнее в сыворотке, далее – в эритроцитах, печени и, наконец, в клетках селезенки. В этой последовательности оксидативному повреждению больше всего подвергается сыворотка крови, далее – эритроциты и печень и меньше всего – селезенка. Такое стрессорное состояние животных отражается и на степени их выживаемости, составляя всего 65-70% (табл.2).

Таблица 2.

Относительное изменение (в %) АС и ПС компонентов крови при острой интоксикации крыс ЦФ.

Биообъект	АС	ПС
Сыворотка	снижение на 57,4	повышение на 145,3
Эритроциты	нет изменений	повышение на 117,8
Печень	снижение на 41,7	повышение на 54,5
Селезенка	нет изменений	повышение на 47,1

**5. Регулирующий эффект галармина на уровень и активность МП при интоксикации крыс ЦФ.** При интоксикации крыс ЦФ наблюдается резкое увеличение уровня цит  $b_5$  (в 2,5 раза) и  $eNox$  (на 78,5%) и снижение содержания  $Nox$  ЭМ, по сравнению с контрольными показателями. Эти явления, скорее всего, связаны с потерей стабильности эритроцитов и увеличением агрегации  $Nox$  ЭМ. Однако степень агрегации  $Nox$  в МКС и МКМ снижена, из-за чего повышается уровень отщепленной  $Nox$ . С другой стороны, заметное снижение уровня ( $A_{430}$  нм) NADPH-содержащего  $O_2^-$ -продуцирующего липопротеина сыворотки супрола (его  $O_2^-$ -продуцирующая активность не изменяется) считается положительным фактором, так как сохраняется вязкость сыворотки и в целом микроциркуляция крови. Галармин в лечебном режиме в большинстве случаев регулирует уровень и активность МПА и МАА в крови и клетках тканей, оказывая антистрессорный эффект (табл. 3).

Следует добавить, что при этом галармин действует и на ферриНб-восстанавливающую активность при интоксикации ЦФ, оказывая регулирующее влияние на кислородный гомеостаз.

Супероксид-продуцирующая активность МПА при острой интоксикации крыс ЦФ под влиянием внутрибрюшинно введенного галармина (ЦФ + галармин).

фермент	Контроль	ЦФ (ОГ-1)	ЦФ+галармин (ОГ-2)
Nox из ЭМ	12,9 ± 1,4	18,4 ± 1,7	17,0 ± 1,4
Nox из МКС	14,1 ± 1,5	2,4 ± 0,2	12,3 ± 0,7
Nox из МККМ	22,3 ± 1,8 P < 0,02	25,3 ± 2,7 P < 0,02	26,9 ± 2,8 P < 0,02
eNox из сыворотки крови	25,1 ± 4,4	17,1 ± 3,0	22,4 ± 2,4
Супрол	11,8 ± 1,1	14,3 ± 1,7	14,4 ± 1,6

**6. Влияние ДР на уровень и активность МП из тканей крыс *in vitro*.** Инкубирование ДР непосредственно с изоформами Nox *in vitro* приводит к существенным изменениям оптико-спектральных свойств этих ферментов из ЭМ и МКС, а также eNox (рис. 5).

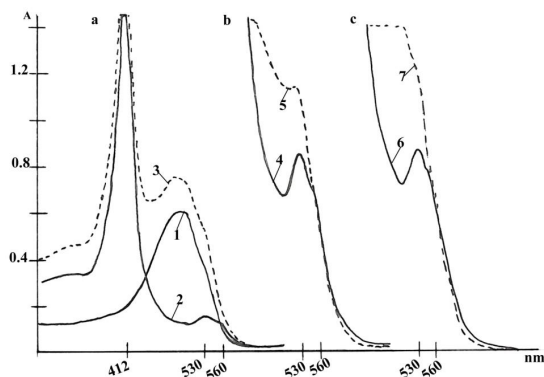


Рис. 5. Оптические спектры поглощения изоформ цит  $b_{558}$  кислого характера под влиянием ДР (0.03 мг/мл), после 24 ч инкубирования ДР с этими гемопротейнами при 4<sup>0</sup> С. а–оптические спектры поглощения: ДР (1), экстрацеллюлярный цит  $b_{558}$  до (2), и после его инкубирования с ДР (3); б–оптические спектры поглощения цит  $b_{558}$  кислого характера из ЭМ крыс до (4) и после инкубирования с ДР (5); в–оптические спектры поглощения цит  $b_{558}$  кислого характера из МКС крыс до (6) и после инкубирования с ДР (7).

ДР отцательно действует на хромофорную группу этих мембранных Nox, в отличие от показателей eNox. Однако эти изменения не вызывают снижения NADPH-зависимой O<sub>2</sub><sup>-</sup> продуцирующей активности, напротив, она даже повышается (табл. 4), в отличие от ферриHb-восстанавливающей активности, которая снижается под влиянием ДР.

Таблица 4.

Относительное изменение (%) уровня (поглощение A<sub>530</sub>) NADPH-зависимой O<sub>2</sub><sup>-</sup> продуцирующей активности цит b<sub>558</sub> из ЭМ, МКС и экстрацеллюлярной цит b<sub>558</sub> после 24 ч инкубирования ДР с этими гемопротеинами, по сравнению со 100%-ми показателями интактных цит b<sub>558</sub>, p < 0.05, n=6.

ткань	Уровень (A <sub>530</sub> )	NADPH-зависимая O <sub>2</sub> <sup>-</sup> продуцирующая активность	метHb-восстанавливающая активность
ЭМ крыс	↓57.7	↑18.3	↓21.4
МКС крыс	↓42.5	↑10.9	↓18.9
Сыворотка крови крыс (eNox)	0	↑12.3	↓10.1

В результате инкубации ДР с Cu, Zn-СОД и каталазой в рассматриваемых условиях *in vitro* активность Cu, Zn-СОД снижается на 31.4±4.4% (P < 0.03), а активность каталазы практически не изменяется. Возможно, именно таким образом ДР изменяет окислительно-восстановительный статус и кислородный гомеостаз эритроцитов и клеток селезенки, вызывая нарушение их нормального функционирования. Благодаря этим эффектам ДР может способствовать гибели опухолевых клеток. Однако не исключено, что ДР, по-видимому, вызывает нарушение функционирования и нормальных клеток (в частности, эритроцитов и клеток селезенки) у больных с опухолями, что дает основание для более осторожного выбора назначаемой дозы и периодичности ДР в клинике.

**7. Регулирующее действие галармина на уровень и активность МП тканей крыс при кардиотоксичности и нефротоксичности индуцированных ДР.** В рассматриваемой концентрации ДР оказывает кардиотоксичное и нефротоксичное действие, которое ассоциировано с неадекватными изменениями уровня и активности ключевых МПА (изоформы Nox и цитохром С), МАА (суммарная фракция Cu,Zn-СОД и Mn-СОД и каталаза) в клетках сердечной и почечной тканей (рис. 6 и 7).

В наблюдаемом режиме введенный крысам галармин еще больше подавляет отщепление цит С из клеток почечной и сердечной тканей (на 50,0±4,7% и 41,1±3,5%, соответственно). Как применение ДР, так и введение ДР+галармина не приводят к изменению формы оптических спектров суммарной фракции цит b<sub>558</sub> из клеток тканей сердца и почек.



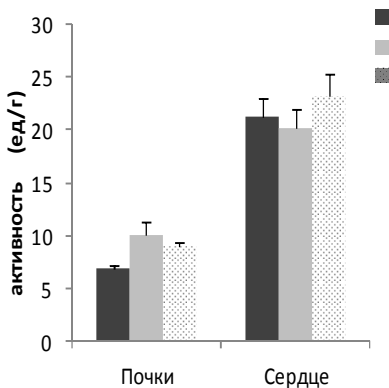


Рис.6. Плотность оптического поглощения (при 530 нм) Nox из клеточных формирований сердечной и почечной ткани крыс под влиянием внутрибрюшинно введенных ДР и ДР+галармина: а – контрольная группа подопытных крыс; б – после введения ДР; в – после введения ДР+галармина.

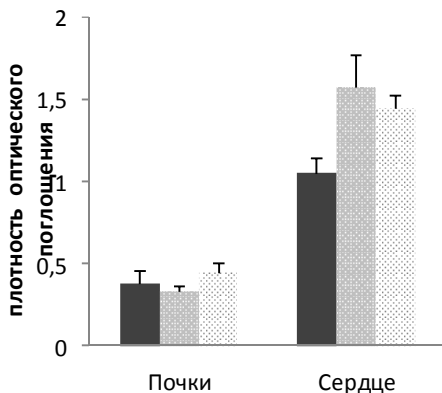


Рис.7. NADPH-зависимая O<sub>2</sub><sup>-</sup> продуцирующая активность фракций изоформ Nox из клеточных формирований сердечной и почечной ткани крыс под влиянием внутрибрюшинно введенных ДР и ДР+галармина: а – контрольная группа подопытных крыс; б – после введения ДР; в – после введения ДР + галармина

Толерантность клеток почек и сердца к ДР выражена в различной степени, а галармин в основном оказывает регулирующее воздействие на уровень и активность как МАА, так и МПА. При этом галармин повышает стабильность митохондрий (в почечных и сердечных клетках), уровня и активности МАА и МПА за счет нейтрализации HO<sup>•</sup>-радикалов, которые могут образоваться при неферментативном расщеплении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, содержание которого повышается под воздействием ДР.

**8. Изменение уровня и активности анти- и прооксидантных МП тканей крыс, индуцированных ДР, и регулирующая роль галармина.** В результате 3-дневного действия ДР, введенного внутрибрюшинно, в клетках органов иммунной системы (селезенка, костный мозг), эритроцитах и сыворотке крови наблюдается резкое повышение содержания изоформ Nox из ЭМ, клеток костного мозга, селезенки и сыворотки крови (eNox) (табл. 5).

Таблица. 5.

Изменение уровня ( $A_{530}$  нм) и активности Nox тканей крыс под влиянием внутрибрюшинно введенного ДР и ДР+ПБП-1 по сравнению с контрольными показателями (показатели крыс, получивших только физраствор),  $p < 0,05$ ,  $n = 6$

а. Изменения уровня изоформ Nox

Ткань	ДР (ОГ-1)	ДР + ПБП-1 (ОГ-2)
ЭМ (1мл/1мл)	$0,82 \pm 0,06$ ( $P < 0,03$ )	$0,68 \pm 0,04$ ( $P < 0,03$ )
Селезенка (1мл/1г)	$0,99 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,05$
Костный мозг (1мл/1г)	$1,16 \pm 0,1$ ( $P < 0,02$ )	$0,97 \pm 0,04$ ( $P < 0,02$ )
Сыворотка крови (1мл/1мл)	$0,41 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$

б. Изменение NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей активности изоформ Nox

Ткань	ДР (ОГ-1)	ДР + ПБП-1 (ОГ-2)
ЭМ (ед/мл)	$15,7 \pm 1,1$	$15,0 \pm 1,0$
Селезенка (ед/г)	$18,8 \pm 1,8$	$17,1 \pm 1,7$
Костный мозг (ед/г)	$28,6 \pm 3,1$	$25,9 \pm 4,0$
Сыворотка крови (ед/мл)	$31,6 \pm 3,5$ ( $P < 0,03$ )	$29,6 \pm 4,3$ ( $P < 0,03$ )

в. Изменение ферриНв-восстанавливающей активности изоформ Nox

Ткань	ДР (ОГ-1)	ДР + ПБП-1 (ОГ-2)
ЭМ (ед/мл)	$6,0 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,3$
Селезенка (ед/г)	$5,8 \pm 0,1$ ( $P < 0,03$ )	$6,6 \pm 0,2$ ( $P < 0,03$ )
Костный мозг (ед/г)	$5,6 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,4$
Сыворотка крови (ед/мл)	$7,0 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,3$

При этом заметно увеличивается и NADPH-зависимая  $O_2$ -продуцирующая активность изоформ Nox. С другой стороны, ДР существенно подавляет ферриHb-восстанавливающую активность фракций изоформ цит  $b_{558}$  кислого характера. Введенный в лечебном режиме галармин в рассматриваемых условиях заметно приближает уровень NADPH-зависимой  $O_2$ - продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности к норме. Введенный крысам ДР, наоборот, вызывает снижение активности ключевых МАА. Существенно снижается также активность каталазы в цитоплазме эритроцитов, селезенки и клеток костного мозга после введения ДР в указанном режиме; в этих условиях галармин играет регулируемую роль, приближая активность МАА к норме.

Основную причину наблюдаемых изменений можно связать с повышением уровня  $HO^*$ , который является деградирующим элементом МАА и МПА. В этих условиях ПБП-1, имеющий  $HO^*$  улавливающую активность, оказывает антистрессорное действие и может быть рекомендован для совместного применения с ДР при химиотерапии злокачественных новообразований.

### **9. Характерное изменение уровня и активности металлопротеинов крови пациентов, больных раком молочной железы, после неoadьювантной химиотерапии по схеме АС6.**

После проведения неoadьювантного АС6 курса химиотерапии в рассматриваемом режиме сыворотка крови больных имеет красноватую окраску с характерным оптическим спектром поглощения. Это связано с определенным снижением стабильности эритроцитов в крови больных в результате лизиса эритроцитов и проникновения гемоглобина в сыворотку. По сравнению с показателями донорской крови, плотность оптического поглощения ферриHb ( $\alpha$ -полоса поглощения при 565 нм) в центрифугированной (при 10000 об/мин, 15 мин) сыворотке крови больных повышена в  $3,2 \pm 0,6$  раза ( $p = 0,01$ ,  $n = 6$ ).

По сравнению с показателями крови у контрольной выборки, удельное содержание Nox у больных снижено на  $55,2 \pm 5,1\%$  ( $p = 0,03$ ,  $n = 6$ ). С другой стороны, супероксид-продуцирующая активность Nox, полученная из ЭМ при АГ, практически не отличается от таковой в контрольных образцах. Однако ферриHb-восстанавливающая активность Nox из ЭМ крови больных снижена на 15,7%, по сравнению с показателями в контрольных образцах (табл. 6).

Фактически, снижение уровня Nox из ЭМ при АГ вызывает нарушение метаболических окислительно-восстановительных процессов в ЭМ с участием супероксидов. Это приводит к нарушению стабильности и текучести ЭМ. В то же время, форма оптических спектров поглощения экстрацеллюлярной Nox (eNox) сыворотки крови пациентов с АГ также практически не отличается от таковой в контрольных образцах.

Таблица 6

Удельная NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность Nox из ЭМ, а также Cu,Zn-СОД и каталазная активность (ед/мл эритроцитов) фракций, выделенных из цитозоля эритроцитов донорской крови (I) и крови пациентов с АГ (II).

Показатели	I	II
Удельная NADPH- зависимая - $O_2^-$ - продуцирующая активность Nox ЭМ	11,2 ± 0,1 (P = 0,01)	11,7 ± 0,3 (p = 0,01)
Удельная ферриHb- восстанавливающая активность Nox ЭМ	12,3 ± 1,2 (P = 0,1)	10,3 ± 0,4 (P = 0,03)
Удельная NADPH- зависимая- $O_2^-$ - продуцирующая активность eNox	24,8 ± 3,3 (P = 0,01)	25,1 ± 3,8 (P = 0,05)
Удельная ферриHb- восстанавливающая активность eNox	15,3 ± 0,3 (P = 0,03)	13,3 ± 1,2 (P = 0,01)
Cu,Zn-СОД активность	271,3 ± 27,8 (P = 0,02)	260,8 ± 19,7 (P = 0,01)
Каталазная активность	1903,4 ± 183,4 (P = 0,07)	1897,5 ± 140,5 (P = 0,05)

Можно заметить, что в результате комбинированной терапии ЦФ с ДР активность ключевых антиоксидантных ферментов СОД и каталазы в крови больных с АГ приближается к норме, однако уровень и активность прооксидантных МП (Nox и eNox) изменяются неадекватным образом. При этом снижение содержания Nox в ЭМ компенсируется повышением уровня eNox в сыворотке крови, регулируя тем самым прооксидантный статус и иммунную систему крови пациентов с АГ. Возможно, что при агранулоцитозе введение экзогенной Nox из ЭМ доноров может иметь положительное компенсаторное воздействие на больных с пониженным уровнем Nox ЭМ после проведения курса химиотерапии в рассматриваемых условиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения молекулярно-биохимических последствий воздействия ЦФ и ДР на клеточном уровне нами было проведено экспериментальное исследование на белых самках и самцах *in vivo*, а также изучено влияние этих цитотоксических агентов *ex vivo* и *in vitro*. Установлено, что в зависимости от пола крыс изменение уровня NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox из ядер, митохондрий и мембран клеток, а также активности ключевых антиоксидантных ферментов цитозоля клеток селезенки, сердца, почек, печени и мозга у самок и самцов происходит различным образом. В результате четырехдневного аэробного инкубирования крови крыс с ЦФ при 4°C *ex vivo* прооксидантная толерантность сыворотки самок превышает таковую у самцов. Однако прооксидантная толерантность ЭМ меньше у самок, по сравнению с аналогичными показателями у самцов. Это свидетельствует о том, что после аэробного инкубирования крови с ЦФ стабильность эритроцитов крыс самок уступает таковой у самцов. Под влиянием ЦФ *ex vivo* происходит снижение уровня каталазы с одновременным накоплением перекиси водорода (соответственно, и производных от нее гидроксильных радикалов – продуктов неферментного расщепления) в гомогенатах тканей. Параллельно с этим наблюдаются и различного диапазона изменения уровня и активности МАА и МПА, являющихся регуляторами метаболизма активных форм кислорода. В экспериментах по определению эффектов ЦФ *in vivo* было показано, что суммарное содержание МАА и МПА (включая и цит С), т.е. соответствующих характеристик антиоксидантного (АС) и прооксидантного статуса (ПС), подвергается характерным изменениям при острой интоксикации крыс ЦФ. По сравнению с АС, ПС повышен больше в сыворотке, затем в эритроцитах, печени и в клетках селезенки. Такое стрессорное состояние животных отражается и на степени выживаемости животных, достигающей 65-70%.

Под действием галармина в большинстве случаев наблюдается тенденция сближения биохимических показателей к норме. Механизмы такого регулирующего эффекта препарата, скорее всего, могут быть обусловлены его способностью к нейтрализации высокотоксичных  $HO^{\bullet}$ -радикалов в исследуемых биосистемах. При инкубировании ДР *in vitro* его действие на ключевые МПА (изоформы Nox) из ЭМ, мембран клеток селезенки (МКС), сыворотки крови (eNox) связано с необратимыми структурно-функциональными нарушениями, в первую очередь, – мембранных Nox. При этом наблюдается некоторое повышение NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности Nox из ЭМ и МКС. Одновременно снижается и Cu,Zn-СОД активность, однако  $O_2^-$ -продуцирующая активность супрола, каталазы, NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность eNox практически не изменяются.

Специфика проявления нефротоксичности и кардиотоксичности у крыс под влиянием ДР ассоциирована с характерными изменениями (в результате воздействия  $HO^{\bullet}$ -радикалов) уровня и активности МАА и МПА, которые в большинстве случаев денатурируются в клетках почек и сердца. Эти изменения ассоциированы с резким увеличением уровня eNox сыворотки крови. Возможно, именно таким образом ДР

изменяет окислительно-восстановительный статус и кислородный гомеостаз эритроцитов и клеток селезенки, вызывая нарушение их нормального функционирования. Можно предположить, что данный механизм способствует гибели опухолевых клеток.

Однако не исключено, что ДР может вызвать также нарушение функционирования и нормальных клеток (в частности, эритроцитов и клеток селезенки) у больных со злокачественными опухолями, что дает основание для более осторожного выбора дозы и периодичности назначения ДР в клинике.

При острой интоксикации крыс ДР галармин в большинстве случаев оказывает также регулирующее воздействие на уровень и активность как МАА, так и МПА.

Гематологические осложнения при противоопухолевой химиотерапии (ПХТ) разной степени выраженности встречаются у 88% больных онкологического профиля. Развитие гематотоксических последствий ПХТ в значительной мере зависит от интенсивности образования АФК. В результате комбинированной терапии ЦФ с ДР активность ключевых антиоксидантных ферментов СОД и каталазы в крови больных с АГ приближается к норме, однако изменение уровня и активности прооксидантных металлопротеинов (Nox и eNox) не проявляет определенной закономерности. Снижение уровня Nox в ЭМ компенсируется повышением содержания eNox в сыворотке крови, регулируя тем самым прооксидантный статус и иммунную систему крови пациентов с АГ.

## ВЫВОДЫ

1. Повреждающие эффекты циклофосамида (ЦФ) и доксорубина (ДР) *in vitro* ассоциированы с характерными изменениями оптических спектральных показателей, NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ NADPH-оксидазы (Nox) и активности антиоксидантных металлопротеинов (МП) из клеточных формирований крыс.
2. Деградирующее воздействие ЦФ и ДР *ex vivo* проявляется в необратимых изменениях уровня и активности изоформ Nox и антиоксидантных МП в крови и гомогенатах тканей крыс.
3. Толерантность анти- и прооксидантных металлопротеинов крыс к ДР и ЦФ в большинстве случаев выше у самок, по сравнению с самцами, хотя стабильность эритроцитов самок уступает таковой у самцов.
4. Повреждающие эффекты ЦФ и ДР на Nox и антиоксидантные МП тканей крыс *in vivo* обусловлены воздействием повышенных доз перекиси водорода и гидроксильных радикалов.
5. При ЦФ- и ДР-индуцированном повреждении МП у крыс *in vivo* протекторный эффект галармина обусловлен нейтрализацией гидроксильных радикалов.
6. При агранулоцитозе у женщин с злокачественной опухолью молочной железы прооксидантный статус сыворотки крови выше антиоксидантного при комбинированной терапии ЦФ и ДР.
7. При лечении злокачественной опухоли молочной железы предлагается использовать комбинированную терапию галармином с ЦФ и ДР.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Геворкян Г.А., Тадевосян Л.Г., Айрапетян Р.Л., Оганян Р.М. Экспериментальная модель агранулоцитоза индуцированная циклофосфамидом. // Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики. Международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО, посвященный 100-летию академика Н.М. Сисакяна, Ереван-Аштарак, апрель 2-4, 2007, с. 63-64.
2. Тадевосян Л.Г., Симонян Г.М., Симонян М.А., Геворкян Г.А. Резкое повышение прооксидантного статуса тканей крыс при острой интоксикации циклофосфамидом. // Мед. наука Армении НАН РА, XLVII, № 4, 2007, с. 34-38.
3. Симонян Р.М., Аракелян Л.Н., Бабян М.А., Тадевосян Л.Г., Оксюзян Г.Р., Симонян Г.М., Алексанян С.С., Симонян М.А. Повышение уровня сывороточных изоформ цитохрома  $b_{558}$  у самок белых крыс по сравнению с особями мужского пола. // Кровь (Мат. межд. научно-практической конференции), 2008, № 2 (8), с. 95.
4. Тадевосян Л.Г., Симонян Г.М., Симонян М.А., Геворкян Г.А. Влияние циклофосфамида на активность антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов тканей крыс *ex vivo*. // Мед. наука Армении НАН РА, 2009, XLIX, № 2, с.23-30.
5. Тадевосян Л.Г., Симонян Г.М., Симонян М.А., Геворкян Г.А. Различные толерантности металлопротеинов анти- и прооксидантной активностикрови крыс самок и самцов после четырехдневного аэробного инкубирования крови с циклофосфамидом. // Мед.наука Армении НАН РА, 2009, XLIX, № 3, с.57-65.
6. Тадевосян Л.Г., Аракелян Л.Н., Симонян М.А., Геворкян Г.А. Изменение уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов в клеточных формированиях тканей по половым признакам. // Мед. наука Армении НАН РА, 2010, L, № 2, с.33-44.
7. Тадевосян Л.Г., Аракелян Л.Н., Симонян М.А., Айрапетян Р.Л., Галоян А.А., Геворкян Г.А. Изменение уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов тканей крыс, индуцированных доксорубицином, и регулирующая роль богатого пролином пептида. // Межд. конференция “ Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии”. Кровь, № 1 (10), Ереван-Степанакерт, 2010, с.99-106.
8. Тадевосян Л.Г. Влияние доксорубицина на уровень и активность металлопротеинов из тканей крыс *in vitro*. // Доклады Академии наук, 2011, № 2, с. 44-51.
9. Тадевосян Л.Г., Аракелян Л.Н., Симонян М.А., Геворкян Г.А., Галоян А.А. Регулирующее действие галармина на уровень и активность металлопротеинов тканей крыс при кардиотоксичности и нефротоксичности, индуцированных доксорубицином. // Нейрохимия, 2011, № 3 (28), с. 1-5.
10. Тадевосян Л.Г., Симонян Р.М., Бабян М.А., Симонян Г.М., Симонян М.А., Галоян А.А., Геворкян Г.А.Регулирующий эффект галармина на уровень и активность металлопротеинов при интоксикации крыс циклофосфамидом. // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2011, № 5 (65), с. 57-61.
11. Тадевосян Л.Г., Бадалян Л.Г., Алексанян А.С., Григорян А.Ф., Алексанян С.С., Симонян М.А. Характерное изменение уровня и активности металлопротеинов пациентов с раком грудной железы после неоадьювантной химиотерапии по схеме АС. // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2013, № 6 (82), с. 16-19.

**ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԽԱՆԳԱՐՄԱՆ ՈՐՈՇ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑԻԿԼՈՑՈՑՏԱՄԻՐՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ  
ԱԳՐԱՆՈՒԼՈՑԻՏՈՋԻ ՏԱՄԱՆԱԿ**

**ԱՄՓՈՓՈՒՄ**

Ներկայումս կատարվում են լայնածավալ հետազոտություններ քիմիաթերապիայում լայնորեն օգտագործվող ցիկլոֆոսֆամիդի (ՑՖ) և դոքսոռուբիցինի (ԴՌ) կողմնակի ազդեցությունների մեխանիզմները բացահայտելու նպատակով: Մակայն առ այսօր էքսպերիմենտում մոլեկուլային-կենսաքիմիական մակարդակով դեռևս չեն ուսումնասիրվել հյուսվածքների բջջաբաղադրամասերից ստացված և մաքրված NADPH օքսիդազի (Nox կամ ցիտոքրոմ b<sub>558</sub>) իզոմերի որակական և քանակական փոփոխությունները ինչպես ՑՖ, այնպես էլ ԴՌ ազդեցությամբ *in vitro*, *ex vivo* և *in vivo*, գալարմինի առկայության և բացակայության ժամանակ:

Նախապես որոշվել է արունների համեմատությամբ էգ առնետների օգտագործման նպատակահարմարությունը՝ որպես իմունոլոգիապես ավելի ակտիվ օրգանիզմներ: ՑՖ-ի հետ արյան 4 օր 4°C ինկուբացման արդյունքում, *ex vivo* շիճուկի պրոօքսիդանտային կարգավիճակը էգ առնետների մոտ ավելին է, քան արունների մոտ և ընդհակառակը՝ էգ առնետների էրիթրոցիտների կայունությունը ՑՖ հանդեպ պակաս է արունների համեմատ: Այս գործընթացները զուգակցվում են առնետների հյուսվածքներում հակա- և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների բնորոշ փոփոխությունների հետ: ՑՖ սուր թունավորման դեպքում դիտվում է առնետների հյուսվածքների պրոօքսիդանտային կարգավիճակի աճ՝ հակաօքսիդանտային համեմատ (արյան շիճուկում, էրիթրոցիտներում, լյարդում, փայծաղում): Նույն պայմաններում ԴՌ նույնպես ցուցաբերում է վնասակար ազդեցություն, զգալիորեն փոփոխելով առնետների հյուսվածքների հակա- և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների հատկությունները: Այս առումով արյան շիճուկի արտաբջջային Nox-ը (eNox) ցուցաբերում է ավելի բարձր դիմացկունություն ԴՌ նկատմամբ: Առնետների մոտ ԴՌ հարուցված նեֆրոտոքսիկության և կարդիոտոքսիկության մեխանիզմները ասոցացված են էրիկամներում և սրտում հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների մակարդակների և ակտիվությունների բնութագրական փոփոխությունների հետ, որպես հետևանք հիդրօքսիլ ռադիկալի քանակի կտրուկ բարձրացման (դիտվում է կատալազի և ՍՕԴ ակտիվության էական նվազում): Միաժամանակ կտրուկ



բարձրանում է Nox իզոմների և eNox մակարդակը: Հնարավոր է, որ ԴՌ այս մեխանիզմով փոփոխում է էրիթրոցիտների և փայծաղի բջիջների ֆիզիոլոգիական և օքսիդա-վերականգնման կարգավիճակը: Գործելով այս մեխանիզմով, ԴՌ կարող է խթանել ուռուցքային բջիջների ապոպտոզը: Այս կերպ ազդելով՝ ԴՌ և ՑՑ կարող են հանգեցնել նաև նորմալ բջիջների վնասման: Բուժական ռեժիմով առնետներին ներարկված գալարմինի ազդեցության տակ մեծ մասամբ դիտվում է ՑՑ և ԴՌ կողմից հարուցված հակա- և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների ցուցանիշների մոտեցում ստուգիչ չափանիշներին: Առաջին անգամ կլինիկայում որոշվել են ագրանուլոցիտոզի ժամանակ ՑՑ և ԴՌ համակցված բուժում ստացող կրծքագեղձի ուռուցքով հիվանդ կանանց և առողջ մարդկանց արյան էրիթրոցիտների թաղանթներից և արյան շիճուկից ստացված Nox-ի իզոմների համեմատական բնութագրական փոփոխությունները: Որոշվել են այդ ֆերմենտների օպտիկական սպեկտրալ հատկանիշները և դրանց ՆԱԴՔԻ կախյալ սուպերօքսիդ գոյացնող ու ֆերիԻԻՅ վերականգնող ակտիվությունը: Քիմիաթերապիայի հետևանքով առկա հեմատոտոքսիկ փոփոխությունները դիտվում են ուռուցքով հիվանդների շուրջ 88% մոտ: Կրծքագեղձի ուռուցքով հիվանդներին ՑՑ և ԴՌ համակցված քիմիաթերապիայի արդյունքում, ագրանուլոցիտոզի ֆոնի վրա դիտվում է արյան հիմնական հակաօքսիդանտային ֆերմենտների (ՍՕԴ, կատալազ) ակտիվությունների մոտեցում ստուգիչ ցուցանիշներին (առողջ մարդկանց արյան ցուցանիշներ): Սակայն ագրանուլոցիտոզի դեպքում այս պայմաններում էրիթրոցիտների թաղանթների Nox և շիճուկի eNox մակարդակները փոփոխվում են ոչ հավասար կերպով, էապես նվազում է էրիթրոցիտների կայունությունը: Էրիթրոցիտների թաղանթներից ստացված Nox մակարդակի նվազումը կոմպենսացվում է արյան շիճուկից ստացված eNox մակարդակի աճով, կարգավորելով հիվանդների արյան պրոօքսիդանտային կարգավիճակը և իմունային համակարգի աշխատանքը (Nox իզոմները հանդիսանում են իմունային բջիջներում սուպերօքսիդ ռադիկալների ֆերմենտային գոյացման հիմնական աղբյուրը):

Այսպիսով, ստացված տվյալները նորովի են գնահատում ՑՑ և ԴՌ վնասակար ազդեցության մեխանիզմները ուռուցքով հիվանդների արյան վրա և առնետների հյուսվածքներում, ի հայտ բերելով գալարմինի պաշտպանիչ դերը, որը հնարավորություն է ընձեռում ԴՌ և ՑՑ համակցված քիմիաթերապիայի դեպքում կիրառել գալարմին այս պրեպարատների կողմնակի ազդեցությունները կանխելու նպատակով:

SPECIFICITIES OF SHIFTS OF METABOLISM DURING CICLOPHOSPHAMIDE  
INDUCED AGRANULOCITOSIS

SUMMARY

A large-scale research is currently being carried out to determine the molecular – biochemical mechanisms of side effects of cyclophosphamide (CF) and doxorubicin (DR), which are widely used in cancerotherapy.

However, the CF-induced or DR-induced quantitative and qualitative changes of isoforms of NADPH oxidase (NOX or cytochrome b<sub>558</sub>) isolated and purified from the tissue cells *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* in the presence and absence of galarmin have not been studied at molecular level during the experiment yet.

The expediency of the use of the blood of female rats, as immunologically more active organisms, has been decided beforehand. Besides, as a result of incubation of the serum with CF at 4°C for 4 days *ex vivo*, the pro-oxidative status of the serum at female rats is higher than at males. On the contrary, the stability of erythrocytes against CF is greater in female than in male rats.

These processes are accompanied with characteristic changes of anti- and pro-oxidative statuses in rat tissues. During the acute intoxication of the rats with CF, the pro-oxidative status of rat tissues increases as compared to the anti-oxidative status (in blood serum, erythrocytes, liver and spleen).

In similar conditions DR also causes a damaging effect, significantly changing the properties of anti- and pro-oxidative metalloproteins of rat tissues. In this regard, the extracellular Nox (eNox) of the blood serum displays higher resistance against DR. Nephrotoxicity and cardiotoxicity mechanisms induced by DR are associated with the characteristic changes of level and activity of metalloproteins with anti- and pro-oxidative activity in the kidney and heart of rats, which is a result of the sharp increase of the quantity of hydroxyl radicals (significant decrease of the activity of SOD and catalase is observed).

At the same time, the level of Nox isoforms and of eNox sharply increases. In this way DR probably changes the oxidation-reduction and physiological status of erythrocytes and spleen cells. This way, DR may also stimulate the apoptosis of tumor cells. As a consequence, DR and CF may also damage the normal cells. Under such an influence of galarmin injected into rats in therapeutic regime, the anti- and pro-oxidative statuses induced by CF and DR approach the control indices, significantly reducing the death toll of animals (65-70%).

Passing from the data received in experiment to data received in the clinics, we should note that the comparative characteristic changes of isoforms of Nox from the blood erythrocytes membranes and serum of both the donors and women with breast cancer during the combination therapy of agranulocytosis with CF and DR in clinics have been determined.

In particular, the optical spectral properties and their NADPH-depending superoxide producing and ferrihemoglobin-reducing activities of these ferments have been determined. The hematotoxic changes occurred as a result of their abovementioned antitumor chemotherapy are observed at about 88% of patients with tumour. As a result of combination chemotherapy with CF and DR for breast cancer patients, the activities of essential anti-oxidative ferments (SOD, catalase) approach the control data (donor blood indices) due to agranulocytosis.

However, in case of agranulocytosis, in such conditions the levels Nox isoforms and eNox from erythrocyte membranes and blood serum change not equally, and the stability of erythrocytes significantly decreases.

The decrease of the level of Nox produced from erythrocytes membranes is compensated by the increase of the level of eNox produced from blood serum, regulating the pro-oxidative status of patients' blood and the physiological processes of the immune system. (Nox isoforms are considered the essential source of enzymatic formation of superoxide radicals in immune cells.)

Thus, the obtained results assess the mechanisms of the damaging influence of CF and DR on the blood of patients with tumor in clinics as well as in rat tissues in a new way, determining the protective effect of galarmin. This, in turn, gives an opportunity to use galarmin during DR and CF chemotherapy to prevent the side effects of these drugs.