



Снижение токсического эффекта циклофосфана при совместном действии с аминокислотами в культуре ткани печени

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Резюме. В органотипической культуре исследовали сочетанное влияние ипритоподобного агента циклофосфана и кодируемых L-аминокислот на развитие процессов пролиферации и апоптоза в эксплантатах ткани печени половозрелых крыс. Различные аминокислоты в концентрации 0,05 мг/мл оказывали либо стимулирующее, либо угнетающее действие на клеточную пролиферацию в зоне роста эксплантатов. При введении в культуральную среду циклофосфана в концентрации 1 мг/мл происходило угнетение клеточной пролиферации за счет развития апоптоза, верифицированного при иммуноцитохимическом выявлении повышенной экспрессии белка p53. Сочетанное введение циклофосфана совместно с каждой из аминокислот приводило к значительному снижению ингибирующего влияния циклофосфана.

Аминокислоты с заряженным боковым радикалом, – кислым у глутаминовой кислоты и основным у аргинина – оказались способными полностью устранять ингибирующий эффект циклофосфана в органотипической культуре ткани печени крыс. Аминокислоты с заряженными боковыми цепями могут рассматриваться в качестве простейших регуляторов и стимуляторов физиологических функций. Известно, что из всех физико-химических свойств аминокислот именно гидрофобность их боковых групп очень важна для их межмолекулярных взаимодействий. Механизмы действия данных аминокислот на клетки могут иметь универсальные черты, что согласуется с предположением об участии электростатических и гидрофобных взаимодействий в этих процессах. Таким образом, L-аминокислоты могут оказывать протекторное влияние на клеточную пролиферацию ткани печени при токсическом действии ипритоподобных агентов.

Ключевые слова: циклофосфан, культура ткани, печень, аминокислоты, клеточная пролиферация, протекторы, иприт, эксплантанты.

Введение. Циклофосфан, или циклофосфамид, является алкилирующим цитостатическим препаратом с характерным химическим строением: его молекула имеет две фосфамидные связи и одну фосфорноэфирную связь. Циклофосфан, как и большинство цитостатиков, прямо или косвенно подавляет удвоение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в S-фазе клеточного цикла. Группа алкилирующих агентов взаимодействует с молекулами ДНК, блокируя при этом процессы транскрипции и репликации. К алкилирующим агентам относят химические соединения, образующие ковалентные связи с нуклеиновыми основаниями. Если в таких веществах имеются две реакционноспособные группировки, то в двунитовой (ДНК) образуются внутри- и межмолекулярные мостики, что приводит к изгибу двойной спирали. Поэтому молекулярный механизм токсического действия циклофосфана связан с его алкилирующими свойствами и вследствие этого с его способностью вступать в связь с анионами фосфорных и карбоновых кислот, фенолов, а также с аминогруппами. Эти химические радикалы широко представлены в нуклеиновых кислотах, ферментах и структурных белках. В этой связи их цитостатический эффект начинается уже в фазе G1 клетки и содей-

ствует торможению в фазе S, затем прекращаются митозы в клетках.

Циклофосфан в качестве ипритоподобного агента используется для моделирования действия иприта, который также обладает алкилирующими свойствами и взаимодействует с молекулами ДНК [7, 8, 10]. Впервые иприт как боевое отравляющее вещество был применен во время Первой мировой войны [5]. Во время Второй мировой войны многими воюющими державами были заготовлены большие запасы этого отравляющего вещества. Принятие Парижской «Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия», которая была ратифицирована в нашей стране в 1997 г., явилось прогрессивным шагом на пути избавления людей от одного из видов оружия массового поражения. Однако, несмотря на то, что Конвенцию приняли более 150 государств, решения ее реализованы далеко не полностью. Уничтожение химического оружия – трудоемкий и опасный процесс, технологии которого и тактика его медицинского обеспечения разработаны не до конца. Опасность иприта как химического оружия имеет две составляющие. Во-первых, это кумулятивное (накапливающееся в организме) вещество, которое к тому

же не сразу распознается, если его концентрация в воздухе невелика. При этом отравляющее действие оказывают любые концентрации иприта в связи с резорбтивным эффектом. Кроме того, хотя аэрозоли иприта не очень стабильны, осевшие аэрозоли надолго (от нескольких дней до месяцев в зависимости от температуры воздуха) отравляют окружающую местность, особенно при наличии водоемов со стоячей водой. Наряду с местным действием иприта на кожу, слизистые оболочки резорбтивное действие происходит через кровь, так как иприт хорошо растворим в липидах и потому быстро всасывается, а разложение иприта в крови происходит относительно медленно. В целом, сильнее всего поражаются те ткани и органы, в которых происходит усиленное размножение клеток. К таким органам с высоким регенерационным потенциалом относится печень. В печени происходит обезвреживание различных чужеродных веществ, в том числе аллергенов, а также промежуточных и конечных продуктов обмена веществ путём превращения их в безвредные, менее токсичные или легче удаляемые из организма соединения. Сохранение целостности клеточного состава печени при действии токсических веществ является актуальной задачей. Поэтому в связи с имеющимися данными о том, что кодируемые аминокислоты служат не только пластическим материалом для построения белковых молекул, но и сами являются сигнальными молекулами, обладающими регуляторными и протекторными свойствами [1, 2, 4, 6], целесообразно исследовать протекторные свойства L-аминокислот при действии ипритоподобных агентов.

Вышеизложенное позволяет считать весьма актуальными вопросы клинической токсикологии, связанные с поражением людей ипритом и ипритоподобными веществами, одним из которых является циклофосфан, используемый для моделирования действия иприта.

Наиболее адекватным и удобным методом для быстрой количественной оценки направленности влияния исследуемых биологически активных веществ является органотипическое культивирование фрагментов тканей и анализ зоны роста эксплантатов. Это связано с тем, что изменение количества клеток является результатом стимуляции или ингибирования клеточной пролиферации, и это изменение служит критерием первичной интегральной оценки биологической активности веществ [5, 9]. Классической тест-системой является органотипическая культура различных тканей крыс.

Цель исследования. Изучение токсического действия различных концентраций циклофосфана в органотипической культуре ткани печени крыс и поиск протекторных агентов в виде кодируемых L-аминокислот.

Материалы и методы. Органотипическое культивирование тканей проводили, используя 700 эксплантатов печени 3-месячных самцов крыс линии

Вистар. Отпрепарированные в стерильных условиях фрагменты печени разделяли на более мелкие части величиной около 1 мм³, которые помещали в чашки Петри с коллагеновым покрытием дна. Питательная среда состояла из 35% среды Игла, 35% раствора Хенкса, 25% фетальной телячьей сыворотки. В среду добавляли глюкозу (0,6%), инсулин (0,5 ед/мл), гентамицин (100 ед/мл). Использованы L-аминокислоты фирмы «Sigma» (Соединенные Штаты Америки) – глицин (Gly), аланин (Ala), аспарагин (Asn), гистидин (His), лизин (Lys), серин (Ser), глютамин (Gln), аргинин (Arg), пролин (Pro), аспарагиновая (Asp) и глутаминовая (Glu) кислоты, тирозин (Tyr), цистеин (Cys), валин (Val), треонин (Thr), метионин (Met), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp). Эффективной концентрацией для аминокислот была концентрация 0,05 нг/мл, для циклофосфана 1 мг/мл. В чашки Петри с экспериментальными эксплантатами добавляли 3 мл питательной среды с исследуемой концентрацией препаратов, в чашки Петри с контрольными эксплантатами – 3 мл питательной среды без добавления препаратов. Таким образом, эксплантаты экспериментальной и контрольной групп развивались в одинаковых объемах питательной среды. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37°C в условиях постоянного поступления 5% CO₂ и через трое суток просматривали под фазово-контрастным микроскопом. Определяли индекс площади, который рассчитывали в условных единицах как соотношение площади всего эксплантата (вместе с зоной высеяющихся клеток) к площади центральной зоны эксплантата. С целью визуализации эксплантатов применяли микротеленасадку для микроскопа (серия 10, «МТН-13» фирмы «Альфа-Телеком», Россия). Для расчета индекса площади (ИП) эксплантатов использовали программу PhotoM 1.2. Достоверность различий сравниваемых средних значений ИП контрольных и опытных образцов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Методом иммуноцитохимического исследования эксплантатов в периферической зоне роста на третьи сутки определяли экспрессию проапоптозного белка p53. Иммуноцитохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышинных антител к проапоптозному белку p53 (1:75, Novocastra). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышьи и антикроличьи иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit) с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином.

Результаты и их обсуждение. В 1-е сутки культивирования происходило распластывание эксплантатов на коллагеновой подложке, выделение пролиферирующих и мигрирующих гепатоцитов, фибробластов, составляющих зону роста от края эксплантата. Через 3 суток, если в эксперименте

имелась стимуляция развития зоны роста в результате клеточной пролиферации, ИП экспериментальных эксплантатов увеличивался по сравнению с ИП контрольных эксплантатов. В случаях угнетения зоны роста ИП эксплантатов понижался по сравнению с контрольными значениями.

Для изучения действия циклофосфана на эксплантаты печени в органотипической культуре в питательную среду вводили циклофосфан в концентрациях 0,01–10 мг/мл. ИП эксплантата и концентрация циклофосфана находились в отрицательно-корреляционной дозозависимости. Чем больше увеличивалась концентрация циклофосфана, тем меньше становился ИП экспериментальных эксплантатов по сравнению с ИП контрольных.

Обнаружено, что уже с концентрации 0,01 мг/мл начиналось частичное ингибирование зоны роста, что приводило к статистически достоверному уменьшению ИП на $18 \pm 3\%$ ($n=20$; $p<0,05$), по сравнению с контрольными значениями ($n=22$). По мере увеличения концентраций рост эксплантатов затормаживался еще больше. При концентрации циклофосфана 0,05 мг/мл ИП эксплантатов уменьшался уже на $25 \pm 5\%$ ($n=21$; $p<0,05$) по сравнению с индексом площади в контроле. При введении циклофосфана в культуральную среду в концентрации 1 мг/мл всегда возникало статистически достоверное угнетение развития эксплантатов печени крыс, выражавшееся в снижении ИП на 25–30% по сравнению с ИП контрольных эксплантатов. В то же время, экспрессия проапоптозного белка p53 и концентрация циклофосфана находились в положительно-корреляционной дозозависимости. Чем больше увеличивалась концентрация циклофосфана, тем больше становилась и экспрессия проапоптозного белка в экспериментальных эксплантатах, по сравнению с контролем (табл. 1).

При изолированном введении в культуру печени какой-либо из аминокислот в эффективной концентрации 0,05 нг/мл, наблюдалось либо увеличение ИП эксплантатов на 20–37% по сравнению с ИП контрольных эксплантатов (введение аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты), либо угнетение пролиферации на 20–39%, либо отсутствие какого-

либо влияния, и ИП оставался на уровне контроля при введении аланина, лизина, цистеина, глутамин (табл. 2).

Однако при сочетанном введении циклофосфана в культуральную среду в концентрации 1 мг/мл с аминокислотами в эффективной концентрации 0,05 нг/мл во всех случаях происходило устранение угнетающего эффекта циклофосфана на эксплантаты. Отсутствие ингибирующего влияния циклофосфана выражалось в том, что происходило лишь статистически недостоверное уменьшение зоны роста эксплантатов печени на 2–11%, и таким образом ИП оставался на уровне контрольных значений. Устранение ингибирующего влияния цитостатика на культуру ткани отмечалось при сочетанном с циклофосфаном действии стимулирующих, так и ингибирующих клеточный рост аминокислот, а также при сочетанном действии с аминокислотами, не оказывавшими какого-либо стимулирующего или угнетающего влияния на эксплантаты. Исключение составили аминокислоты гистидин и пролин, не отменявшие угнетающее действие циклофосфана, и ИП оставался статистически достоверно ниже контрольных значений на 16–17%.

Сочетанное действие циклофосфана с глутаминовой кислотой, имеющей отрицательно заряженный боковой радикал и стимулирующей при изолированном введении зону роста эксплантата печени, приво-

Таблица 2

Влияние аминокислот, циклофосфана и их сочетаний на ИП эксплантатов печени крыс (% по отношению к контролю)

Аминокислота, 0,05 нг/мл	Циклофосфан, 1 мкг/мл	Аминокислота+ циклофосфан	
Gly	-35±12*	-27±5*	-1±1
Ala	-13±7	-26±3*	+2±1
Asn	+37±9*	-32±7*	-11±5
Hys	-22±7*	-27±3*	-17*±1
Lys	+14±6	-28±5*	-10±5
Ser	-20±10*	-30±5*	+3±1
Gln	8±3	-23±2*	-4±2
Arg	+27±9*	-25±5*	+18±1*
Pro	-39±14*	-24±3*	-16±1*
Glu	+20±8*	-30±4*	+19±3*
Asp	-30±12*	-27±2*	-1±1
Cys	-13±7	-28±5*	2±1
Tyr	-20±7*	-29±7*	-7±3
Val	-35±14*	-25±5*	-8±5
Thr	-25±11*	-29±5*	-5±1
Met	-29±7*	-26±7*	-11±5
Leu	-30±13*	-27±5*	-8±1
Ile	-28±11*	-29±7*	+2±1
Phe	-28±12*	-32±9*	-7±2
Trp	-25±3*	-26±5*	+5±1

Примечание: * – различия по сравнению с контрольными эксплантатами, $p<0,05$.

Таблица 1

Изменение ИП и экспрессии p53 по отношению к контролю при действии различных концентраций циклофосфана в культуре ткани печени

Циклофосфан, мг/мл	ИП, %	Экспрессия p53, %
0,01	-18±1*	+31±4*
0,05	-25±3*	+43±7*
1	-30±5*	+58±11*
2	-42±5*	+64±9*
10	-85±7*	+79±11*

Примечание: * – различия по сравнению с контрольными эксплантатами, $p<0,05$.

дило не только к полному устранению ингибирующего влияния цитостатика, но и к статистически достоверному увеличению зоны роста эксплантатов селезенки на $19 \pm 3\%$ ($n=24$; $p>0,05$) по сравнению с контрольными значениями ($n=20$). Таким же образом действовала другая стимулирующая аминокислота с положительно заряженным боковым радикалом – аргинин. При комбинированном действии циклофосфана и аргинина ИП увеличивался на $18 \pm 1\%$ ($n=21$; $p<0,05$) по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n=20$).

При изолированном действии циклофосфана в эксплантатах печени крыс происходит угнетение клеточной пролиферации. Аминокислоты при их сочетанном введении с циклофосфаном способны устранять ингибирующее действие токсического агента. Одно из возможных объяснений этого явления состоит в следующем. Ипритоподобное вещество циклофосфан способно вступать в связь с анионами фосфорных и карбоновых кислот, фенолов, а также с аминокислотами. Эти химические радикалы широко представлены в нуклеиновых кислотах, ферментах и структурных белках. Возможно, при сочетанном введении циклофосфана с аминокислотами циклофосфан связывается прежде всего именно с аминокислотами пептида или аминокислот, тем самым теряя возможность связывания с другими химическими радикалами в клетках ткани.

Аминокислоты с заряженным боковым радикалом – кислым у глутаминовой кислоты и основным у аргинина – способны устранять ингибирующий эффект циклофосфана в органотипической культуре ткани печени крыс. Аминокислоты с заряженными боковыми цепями могут рассматриваться в качестве простейших регуляторов и стимуляторов физиологических функций [3, 4, 9]. Известно, что из всех физико-химических свойств аминокислот именно гидрофобность их боковых групп очень важна для их межмолекулярных взаимодействий. Механизмы действия данных аминокислот на клетки могут иметь универсальные черты, что согласуется с предположением об участии электростатических и гидрофобных взаимодействий в этих процессах.

Ранее нами [2, 4] установлено, что эффективной концентрацией для аминокислот была концентрация $0,05$ нг/мл. Это может быть связано с эффектом действия ультрамалых доз. Причем одной из самых характерных черт действия ультрамалых доз веществ является то, что они часто действуют на фоне большого количества того же вещества, присутствующего эндогенно, например, ростовых факторов, гормонов, пептидов, аминокислот. Действие ультрамалых доз, возможно, связано с адаптационными явлениями в клетках различных тканей, то есть клетка может реагировать не на величину присутствующей в организме концентрации аминокислот, а именно на небольшие сдвиги этой концентрации. Эти малые концентрационные сдвиги, по-видимому, и обеспечивают как стимулирующее клеточную пролиферацию действие

аминокислот с заряженными радикалами при изолированном их применении, так и протекторное их влияние при сочетанном применении с циклофосфаном в культуре ткани печени.

Таким образом, при действии циклофосфана, моделирующего резорбтивное действие иприта, в печени происходит угнетение клеточной пролиферации. В случаях отравлений ипритом и ипритоподобными соединениями возможно развитие патологических изменений печени, вплоть до невозможности осуществления ею основных физиологических функций. Полученные в работе данные позволяют обосновать использование кодируемых L-аминокислот, и особенно аминокислот с заряженными боковыми радикалами, для снятия токсического влияния иприта и ипритоподобных веществ.

Выводы

1. Циклофосфан при изолированном действии угнетает клеточную пролиферацию в эксплантатах печени крыс.
2. Все кодируемые L-аминокислоты способны на 20–26% снижать ингибирующий эффект циклофосфана в органотипической культуре ткани печени крыс.
3. Наиболее эффективными протекторами при действии ипритоподобных агентов являются L-аминокислоты с заряженным боковым радикалом (глутаминовая кислота и аргинин), полностью устраняющие ингибирующий эффект циклофосфана в органотипической культуре ткани печени крыс.
4. Обосновано протекторное использование глутаминовой кислоты и аргинина с заряженными боковыми радикалами для снятия токсического влияния иприта и ипритоподобных веществ на ткань печени.

Литература

1. Белокрылов, Г.А. Различия в иммунном ответе, фагоцитозе и детоксицирующих свойствах под влиянием пептидных и аминокислотных препаратов / Г.А. Белокрылов, О.Н. Деревнина, О.Я. Попова // Бюлл. эксперимент. биол. – 1995. – Т. 118, № 2. – С. 509–512.
2. Чалисова, Н.И. Биологическая активность аминокислот в органотипических культурах тканей / Н.И. Чалисова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – № 2. – С. 224–228.
3. Чалисова, Н.И. Динамика стимулирующих и ингибирующих эффектов в органотипической культуре нервной и лимфоидной ткани / Н.И. Чалисова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2001. – Т. 380, № 3. – С. 418–421.
4. Чалисова, Н.И. Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на основные клеточные процессы у молодых и старых животных / Н.И. Чалисова [и др.] // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 189–197.
5. Anderson, D. Sulfur mustard-induced neutropenia: treatment with granulocyte colony-stimulating factor / D. Anderson, W. Holmes, R. Lee // Mil. Med. – 2006. – Vol. 171, № 5. – P. 448–453.
6. Beheshti, J. Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure / J. Beheshti, E. Mark, H. Akbaei // Pathol. Res. Pract. – 2006. – Vol. 202, № 10. – P. 739–744.
7. Ghanei, V. Exposure to a First World War blistering agent / V. Ghanei, H. Khedmat, F. Mardi, // Emerg Med J. – 2006. – Vol. 23, № 4. – P. 296–299.

8. Hefazi, M. Delayed complications of sulfur mustard poisoning in the skin and the immune system of Iranian veterans 16–20 years after exposure / M. Hefazi, M. Maleki, A. Malmoudi // *Int. J. Dermat.* – 2006. – Vol. 45, № 9. – P. 1025–1031.
9. Kimura, M. Effects of branched-chain amino acids on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes / M. Kimura, M. Ogihara, // *Europ. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 510, № 3. – P. 167–180.
10. Richter, M. Keratoplasty after mustard gas injury: clinical outcome and histology / M. Richter, J. Wachtlin, N. Becharkis // *Cornea.* – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 467–469.
-

A.N. Zhekalov, N.I. Chalisova

A decrease of cyclophosphane toxic effect by the combined action with amino acids in the tissue culture of liver

Abstract. *In organotypic culture investigated the combined effect iproto-like agent cyclophosphamide and the encoded L-amino acids on the development of the processes of proliferation and apoptosis in explants of the liver tissue of Mature rats. Various amino acids, in a concentration of 0.05 ng/ml had either a stimulating or a depressing effect on the cellular proliferation in the growth zone of explants. When introduced into the culture medium of cyclophosphamide at a concentration of 1 mg/ml was inhibition of cell proliferation due to the development of apoptosis, verified with immunocytochemical detection of enhanced expression of protein p53. Coadministration of cyclophosphamide in conjunction with each of the amino acids led to a significant decrease in the inhibitory effect of cyclophosphamide. Amino acids with charged side radical, acid from glutamic acid and arginine at a major – was able to completely eliminate the inhibitory effect of cyclophosphamide in organotypic tissue culture of rat liver. Amino acids with charged side chains can be considered as the simplest of the regulators and stimulants of physiological functions. We know that of all the physico-chemical properties of amino acids is the hydrophobicity of the side groups are important for their intermolecular interactions. Mechanisms of action of these amino acids, the cells can have universal features, which is consistent with the assumption about the participation of electrostatic and hydrophobic interactions in these processes. Thus, L - amino acids can have a protective effect on the cell proliferation of the liver tissue from the toxic action iproto-like agents.*

Key words: *cyclophosphamide, tissue culture, liver, amino acids, cell proliferation, protectors, mustard, expentancy.*

Контактный телефон: 8-921-578-38-19; e-mail: jann1960@mail.ru