

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 616-006.6:616.153]-085.277.3-07

©Глазев, Нефёдов

### ИЗМЕНЕНИЯ В АМИНОКИСЛОТНОМ ПУЛЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА NSC-631570: ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ РАКА

*А.А. Глазев, Л.И. Нефёдов\**

НИЛ биохимии биологически активных веществ Гродненского государственного университета им. Янки Купалы, Республика Беларусь, 230017, Гродно, 52, БЛК;  
тел./факс: +375 (152) 48 72 46; тел.: +375 (29) 63 76 982;  
эл. почта: l.nefyodov@grsu.by; www.nil.grsu.by

Ранее в экспериментальных исследованиях (перевиваемые опухоли W-256, SM-1 и PC-1) и клинических наблюдениях (рак мочевого пузыря, молочной и предстательной желез) нами исследовано действие противоопухолевого препарата NSC-631570 (препарат Ukrain®) как эффективного агента, селективно накапливающегося в опухолевой ткани после однократного внутривенного введения, ингибирующего синтез белка в опухолевых клетках и регулирующего метаболический дисбаланс, индуцированный опухолью. Препарат ингибирует метаболические процессы в опухоли и вызывает нарушения метаболизма в опухолевых клетках.

В настоящей работе исследовано влияние NSC-631570 на пул свободных аминокислот у больных злокачественными новообразованиями.

Плазма крови взята от 10 здоровых доноров и от 29 больных с различными локализациями первичных опухолей (рак желудка, прямой кишки, мочевого пузыря, молочной, предстательной желез, хронический лимфолейкоз, неходжкинские лимфомы, миеломная болезнь).

Сравнение концентраций аминокислот в плазме крови онкологических больных и здоровых доноров показало: 1) избирательное действие препарата NSC-631570 на уровни аминокислот с положительно заряженными (His, Arg) или незаряженными полярными (Tyr, Thr, Gln) R-группами; 2) уменьшение концентрации His и повышение концентраций  $\beta$ -Ala и Tau. Установленные изменения зависят от добавленной концентрации препарата и от локализации первичного опухолевого процесса.

На основании литературных данных и полученных результатах предполагается, что одним из механизмов реализации противоопухолевых эффектов NSC-631570 является селективное взаимодействие компонентов препарата с аминокислотами, их дериватами и белками плазмы крови.

**Ключевые слова:** аминокислоты, противоопухолевые эффекты, препарат NSC-631570, диагностика злокачественных новообразований.

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

\* - адресат для переписки

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ

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

Ранее в экспериментальных [2] и клинических [3-6] исследованиях нами было убедительно доказано, что применение противоопухолевого иммуномодулятора и цитостатика NSC-631570 (Ukrain®) – полусинтетического препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого при злокачественном росте значительно изменяет уровни отдельных аминокислот и дериватов в плазме крови и опухолях человека и животных [7, 8]. Эти изменения зависели от локализации и стадии опухолевого процесса [2, 5] и не могли быть полностью объяснены только с позиций известного действия злокачественного роста на процессы обмена аминокислот в организме опухоленосителя [1].

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

Исследование прямого действия препарата на аминокислотный пул плазмы крови онкологических больных предпринято нами с позиций неоднократно доказанного независимыми методами специфического взаимодействия NSC-631570 с опухолевыми клетками и их структурными компонентами, включая клеточные мембраны иммунокомпетентных клеток [9].

**МЕТОДИКА.** В исследование включены 32 больных с основными локализациями диагностированного онкопроцесса при их поступлении на лечение в онкогематологический стационар и 10 здоровых доноров (табл. 1).

Таблица 1. Сводная таблица включённых в исследование больных.

<b>№ группы</b>	<b>Клинический диагноз</b>	<b>Количество больных</b>
<b>1</b>	<b>Здоровые доноры</b>	<b>10</b>
<b>Злокачественные солидные опухоли</b>		
<b>2</b>	<b>Рак желудка</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Колоректальный рак</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Рак молочной железы</b>	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Рак мочевого пузыря</b>	<b>2</b>
<b>6</b>	<b>Рак предстательной железы</b>	<b>2</b>
<b>7</b>	<b>Рак легкого (эпидермоидный вариант)</b>	<b>3</b>
<b>Системные злокачественные новообразования</b>		
<b>8</b>	<b>Хронический лимфолейкоз</b>	<b>2</b>
<b>9</b>	<b>Неходжкинские лимфомы (лимфосаркома)</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>Миеломная болезнь</b>	<b>3</b>

Больных доброкачественными новообразованиями было 3, злокачественными - 29. Из общего числа онкологических больных, солидные опухоли верифицированы у 20, системные - у 9. Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологических исследований операционного или биопсийного материала. Нозологическое распределение больных представлено в таблице 1.

Больные с солидными злокачественными опухолями специальным методам лечения до исследования не подвергались (первичные больные), а период, после ранее проведенной химиотерапии системных новообразований, составлял не менее 3 недель.

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 NSC-631570 в разведениях бидистиллированной водой 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 100 мкл бидистиллированной 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 пробы плазмы крови депротеинизировали, смешивая их с равным объёмом 1 М HClO<sub>4</sub>, и центрифугировали в течение 20 мин при 12000 g. В качестве внутреннего стандарта использовали гомотаурин ("Sigma", США) в концентрации 300 мкМ.

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

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

Свободные аминокислоты и их производные разделяли методом обращённо-фазной хроматографии на колонке Диасорб 130 C<sub>16</sub> T (6 мкм) 3×250 мм ("Элсико", Россия) с изократическим элюированием (0,075M Na<sup>+</sup> - ацетатный буфер pH 6,75 + CH<sub>3</sub>OH 17,5%) при скорости потока 0,6 мл/мин, температуре 30°C после предколоночной дериватизации с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и флуориметрическим детектированием (231/445 нм). В качестве стандарта использовали искусственную смесь L-аминокислот ("Fluka AG", Германия), по 100 мкМ каждого соединения.

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

Это позволило исследовать систему признаков, свойства которой в значительной степени определяются взаимосвязями между перечисленными параметрами, и при помощи числовых значений охарактеризовать её многомерными законами распределения [10].

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

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 NSC-631570; 2) описание

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ

этих закономерностей меньшим, чем число первоначально исследованных соединений, количеством главных компонент; 3) выявление стохастической связи уровня исследованных соединений с главными переменными [12].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** По сравнению с практически здоровыми донорами в плазме крови больных системными и солидными злокачественными новообразованиями наблюдается избирательное действие NSC-631570 на содержание аминокислот с положительно заряженными (гистидин, аргинин) или незаряженными полярными (тирозин, треонин, глутамин) R-группами (табл. 2, 3).

Таблица 2. Концентрации достоверно изменяющихся свободных  $\alpha$ -аминокислот в плазме крови у больных с системными злокачественными новообразованиями (после добавления препарата NSC-631570 в концентрации 20 мкг/мл), мкмоль/л.

<b>Аминокислоты</b>	<b>Здоровый контроль</b>	<b>Хронический лимфолейкоз</b>	<b>Неходжкинская лимфома</b>	<b>Миелозная болезнь</b>
<b>Gln</b>	317,40 ± 53,34	371,83 ± 56,90	324,57 ± 56,84	241,57 ± 79,11
<b>His</b>	81,78 ± 2,99	49,22 ± 5,62*	46,990 ± 6,088*†	51,26 ± 10,93*
<b>Thr</b>	130,35 ± 11,39	94,60 ± 11,69	89,23 ± 12,74	98,82 ± 11,18
<b>PEA</b>	22,30 ± 2,25	12,59 ± 4,75	8,16 ± 1,52*†	9,55 ± 2,31*
<b>Arg</b>	20,76 ± 2,90	25,68 ± 2,24	38,42 ± 5,37*	47,80 ± 7,56*
<b>Tan</b>	133,76 ± 18,92	74,65 ± 10,41	95,62 ± 19,95	89,69 ± 4,22
<b><math>\beta</math>Ala</b>	8,57 ± 3,76	5,82 ± 2,52	5,978 ± 1,072	7,587 ± 2,031
<b>Ala</b>	214,72 ± 14,97	163,31 ± 45,91	183,78 ± 23,44	161,97 ± 7,71
<b>Tyr</b>	175,47 ± 7,92	105,050 ± 21,035*†	97,77 ± 6,16*†	121,20 ± 7,62*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  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.

Таблица 3. Концентрации достоверно изменяющихся свободных α-аминокислот в плазме крови у больных с солидными злокачественными новообразованиями (после добавления препарата NSC-631570 в концентрации 20 мкг/мл), мкмоль/л.

Показатель	Здоровый контроль	Рак желудка	Рак ободочной и прямой кишки	Рак легкого	Рак молочной железы	Рак мочевого пузыря	Рак предстательной железы
Gln	317,40 ± 53,34	419,28 ± 25,97	393,62 ± 32,61	323,498 ± 43,084	552,16 ± 66,91*	261,11 ± 8,64	256,94 ± 57,61
His	81,78 ± 2,99	49,93 ± 5,70*	59,60 ± 5,96*	57,57 ± 10,20*	50,78 ± 4,42*	56,86 ± 21,32*	46,97 ± 3,53*
Thr	130,35 ± 11,39	108,16 ± 16,15	89,59 ± 10,71*	129,39 ± 30,69	120,72 ± 7,36	87,46 ± 9,48	86,386 ± 29,057
PEA	22,30 ± 2,25	11,34 ± 1,98*	12,93 ± 1,86*	9,32 ± 1,30*	4,715 ± 0,603*†	11,093 ± 1,383	10,45 ± 4,23
Arg	20,76 ± 2,90	44,41 ± 11,53*	47,24 ± 7,74*	60,19 ± 11,59*†	47,18 ± 4,27*	49,94 ± 0,45*	34,94 ± 13,22
Tau	133,76 ± 18,92	82,71 ± 5,74	118,62 ± 25,36	87,22 ± 8,86	99,55 ± 9,87	92,32 ± 8,44	81,71 ± 13,72
βAla	8,57 ± 3,76	6,47 ± 1,18	9,70 ± 2,43	6,72 ± 0,66	11,55 ± 1,83	6,19 ± 2,62	11,15 ± 3,51
Ala	214,72 ± 14,97	187,38 ± 16,30	164,75 ± 10,17*	194,008 ± 30,092	207,99 ± 12,10	207,37 ± 63,30	204,005 ± 45,682
Tyr	175,47 ± 7,92	84,56 ± 3,54*†	101,65 ± 7,09*†	106,86 ± 15,32*†	125,46 ± 4,01*	101,66 ± 9,92*†	97,92 ± 12,35*†

Примечание: \* -  $p < 0,05$  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.

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ

Полярность инкубационной среды изменяет спектры флуоресценции в исследованиях взаимодействия NSC-631570 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 [13].

При исследовании спектров флуоресценции плазмы крови, зарегистрированных нами при внесении 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 NSC-631570 с биомолекулами, присутствующими только в плазме крови раковых больных.

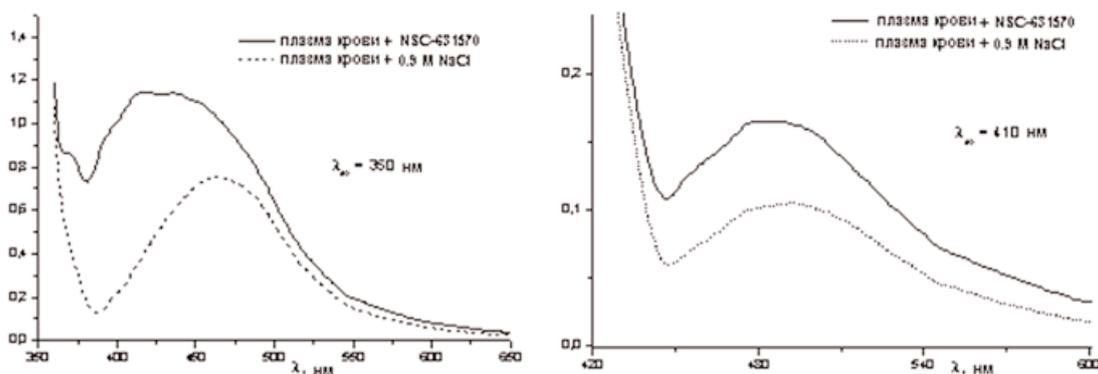


Рисунок 1.

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).

В плазме крови больных злокачественными новообразованиями при инкубации их цельной крови с NSC-631570 по сравнению с практически здоровыми донорами статистически достоверно снижено содержание гистидина и повышен уровень  $\beta$ -аланина и таурина. Изменения в концентрациях перечисленных L-аминокислот значимо зависели от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации NSC-631570 (табл. 2, 3).

Таким образом, при сравнении результатов с применением t-критерия Стьюдента нами получены доказательства различного действия NSC-631570 на уровни свободных L-аминокислот в плазме крови практически здоровых доноров и онкологических больных в зависимости от локализации злокачественного процесса и добавленной концентрации препарата.

В плазме крови здоровых доноров при её инкубации с NSC-631570 отличий в уровнях исследованных соединений от их значений в образцах, не содержащих препарат, практически не выявлено. Одновременно видно, что только при добавлении в концентрации 20 мкг/мл NSC-631570 значимо влиял на концентрацию тирозина.

В зависимости от локализации опухоли (рак ободочной, прямой кишки, молочной железы, неходжкинская лимфома, миеломная болезнь) значимые изменения при инкубации цельной крови с NSC-631570 также наблюдались только в уровне тирозина. Кроме того, изменения, индуцированные добавлением NSC-631570, зарегистрированы также в уровнях гистидина (при раке молочной железы) и таурина (при раке лёгкого и миеломной болезни).

Мы проанализировали корреляционные связи между уровнями исследованных аминокислот и добавленной концентрацией NSC-631570. При этом в плазме крови здоровых доноров между концентрацией NSC-631570 и уровнями тирозина и производных аминокислот - фосфоэтаноламина (PEA) и  $\beta$ -аланина (табл. 4) нами отмечены достоверные корреляции.

Таблица 4. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между добавленной концентрацией препарата NSC-631570 и уровнями аминокислот в плазме крови.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Asp</b>	0,08	-0,14	0,14	0,13	0,27	-0,54	0,16	-0,22	0,04	-0,08	0,40
<b>Asn</b>	-0,08	-0,09	-0,03	-0,10	-0,39	-0,39	0,25	0,20	-0,06	-0,36	-0,04
<b>Glu</b>	-0,11	0,02	-0,06	-0,43	0,39	0,12	0,17	-0,15	0,00	0,11	0,31
<b>Ser</b>	0,04	-0,14	-0,01	-0,18	-0,07	-0,05	0,02	-0,15	0,05	-0,19	0,11
<b>Gln</b>	0,11	-0,26	-0,18	0,37	-0,25	-0,49	0,24	0,34	0,01	-0,24	-0,14
<b>His</b>	0,13	0,05	0,20	0,15	0,15	0,00	-0,08	-0,10	0,38	0,07	0,01
<b>Gly</b>	0,10	-0,14	-0,00	-0,12	-0,15	0,02	-0,19	-0,47	-0,06	0,01	0,36
<b>Thr</b>	-0,09	-0,06	-0,14	-0,08	-0,30	-0,20	0,31	0,07	0,21	-0,28	0,03
<b>PEA</b>	0,29*	0,06	0,06	-0,07	0,05	0,12	0,39	0,05	0,14	-0,05	0,28
<b>Arg</b>	0,00	-0,46	-0,21	-0,04	0,34	-0,25	-0,07	0,05	0,08	-0,22	0,02
<b>Tau</b>	0,21	-0,25	-0,06	0,19	0,54	-0,39	-0,28	-0,10	0,03	0,23	-0,17
<b><math>\beta</math>Ala</b>	0,38*	0,08	-0,10	0,19	0,05	-0,34	-0,25	0,25	-0,17	0,05	-0,35
<b>Ala</b>	-0,11	-0,09	-0,26	-0,11	-0,02	-0,32	0,24	0,20	-0,02	-0,32	-0,08
<b>Tyr</b>	0,73*	0,60*	0,66*	0,65*	0,76*	0,66*	0,44	0,47	0,82*	0,70*	0,74*

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

В плазме крови больных раком желудка, ободочной, прямой кишки, молочной железы, мочевого пузыря или предстательной железы только уровень тирозина коррелировал с добавленной концентрацией NSC-631570, а при раке лёгкого и хроническом лимфолейкозе значимой зависимости между уровнями свободных аминокислот в плазме крови и концентрацией NSC-631570 не выявлено (табл. 4).

С целью выявления эффектов NSC-631570, общих для всех исследованных опухолевых процессов, на уровни определяемых нами соединений был проведен дискриминантный анализ.

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ

Из графика двух главных компонент (рис. 2), полученного при проведении канонического анализа, видно, что NSC-631570 оказывает наиболее выраженное действие на пул свободных аминокислот плазмы крови больных при добавлении его в концентрации 0,2 мг/мл. Это доказывается значениями  $D^2$ -Махаланобиса для групп с указанной добавленной концентрацией NSC-631570 - её удалением от остальных групп относительно первой главной компоненты, которая определяется в основном концентрациями тирозина, треонина и аспарагина (табл. 5).

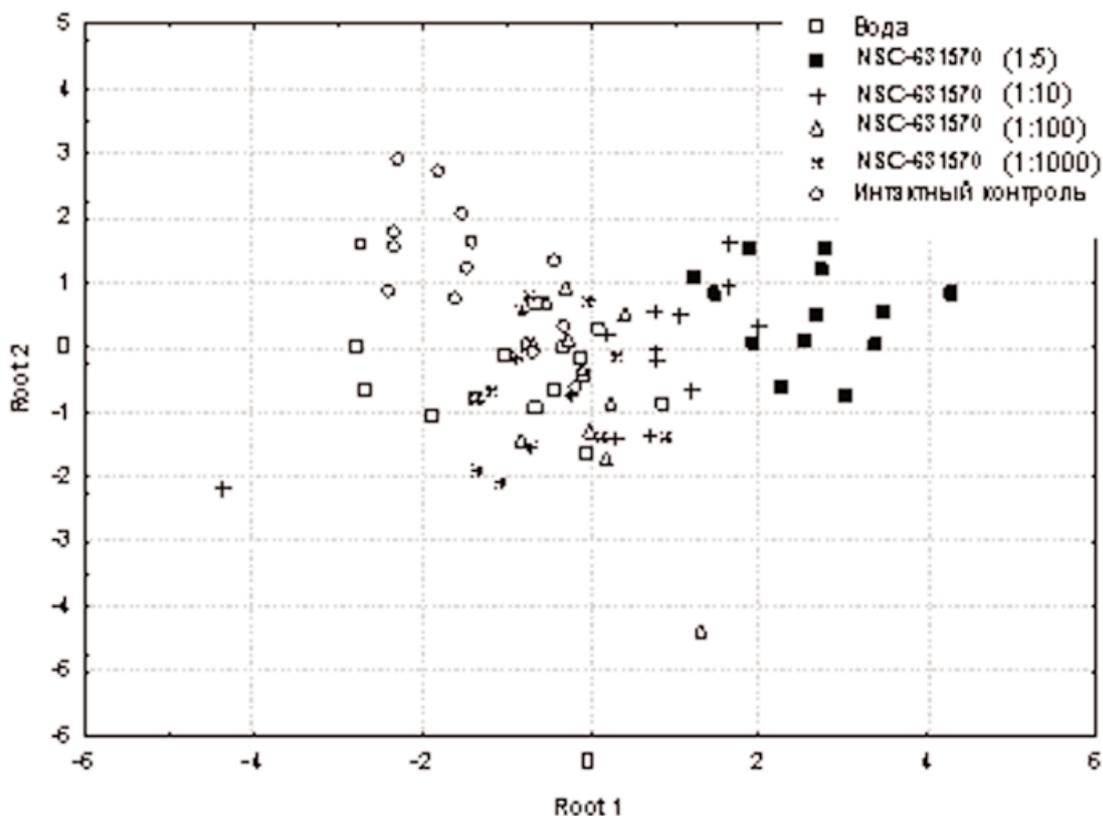


Рисунок 2.

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

Таблица 5. Результаты пошагового дискриминантного анализа при анализе различных концентраций добавленного препарата NSC-631570 без учета локализации опухолевого процесса (Лямбда Уилкса = 0,03160,  $p < 0,00001$ ).

	<b>F</b> вкл/искл	<b>p</b>	<b>Лямбда Уилкса</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Tau</b>	5,464507	0,000256	0,724911	5,464507	0,000256
<b>Tyr</b>	4,547850	0,001181	0,549062	4,963620	0,000004
<b>GABA</b>	3,011826	0,016095	0,451855	4,304567	0,000001
<b>Thr</b>	3,229433	0,011177	0,366166	4,065168	0,000000
<b>Asp</b>	2,442694	0,042738	0,310412	3,762275	0,000000
<b>PEA</b>	1,726056	0,140641	0,274991	3,428335	0,000000
<b>Asn</b>	1,136846	0,349829	0,253185	3,090055	0,000000
<b>Gly</b>	2,914084	0,019569	0,206824	3,115373	0,000000

Одновременно, из рисунка 2 следует, что NSC-631570 при добавлении в концентрации 10 мкг/мл также оказывал эффект на уровни аминокислот в плазме крови больных, однако выраженность этого действия при оценке значений  $D^2$ -Махаланобиса, меньше, а в разведении 1:100 и 1:1000 (1 и 0,1 мкг/мл соответственно) препарат достоверно не влиял на содержание исследуемых соединений в плазме крови онкологических больных.

При этом, основываясь на значениях коэффициентов Фишера, наиболее значимыми следует считать уровни таурина, тирозина, треонина, аспартата и глицина (табл. 5, 6).

Таблица 6. Стандартизированные коэффициенты дискриминантных функций.

	Корень 1	Корень 2	Корень 3	Корень 4	Корень 5
Гли	0,39190	-0,818097	-0,228846	0,497027	0,087165
Тир	2,00614	0,509569	-0,080349	0,193927	0,089699
ГАВА	-1,11970	0,054036	0,141970	0,816833	-0,287820
Тре	-0,41361	-0,606741	0,032592	0,006979	0,189326
Асп	-0,39921	0,469231	-0,905708	-0,076647	0,028287
PEA	0,82697	0,265939	-0,690224	-0,061154	-0,396729
Ала	-1,04022	0,349999	0,510021	0,378051	-0,113572
Глу	0,80745	0,046869	-0,589721	-0,306484	0,864543
Собственное значение	1,89350	0,568344	0,048310	0,012458	0,003850
Интегральное отношение	0,74947	0,974424	0,993545	0,998476	1,000000

Из графика двух главных компонент (рис. 3), полученного при проведении канонического анализа видно, что при различных локализациях опухолевого процесса солидные злокачественные новообразования образуют 4 группы (рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка и остальные злокачественные опухоли), различающиеся по чувствительности к действию препарата NSC-631570.

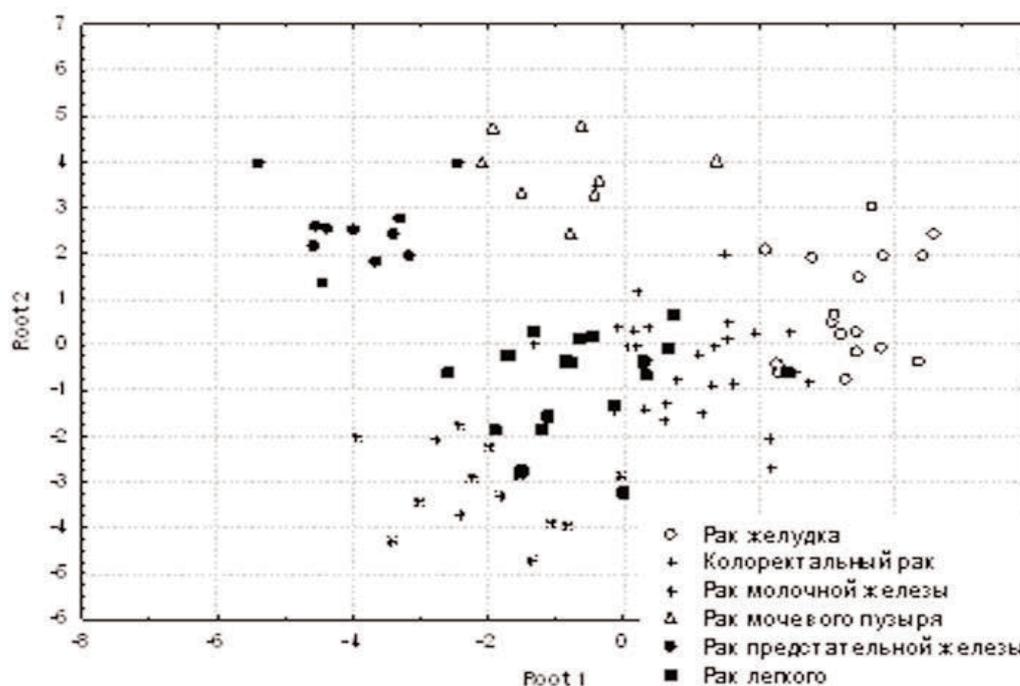


Рисунок 3.

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

## ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА АМИНОКИСЛОТЫ ПЛАЗМЫ

Таким образом, при инкубации NSC-631570 с цельной кровью человека изменяются уровни свободных аминокислот в плазме крови и соотношения между их концентрациями.

Характер действия препарата зависит от локализации опухолевого процесса и его добавленной концентрации. Эффекты на исследованные показатели проявляются 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 NSC-631570 *in vitro* показателем при опухолях данных локализаций является сниженная концентрация тирозина.

Полученные результаты по исследованию закономерностей формирования аминокислотного фонда в плазме крови при злокачественных новообразованиях различной локализации позволяют в целом предположить наличие двух вероятных механизмов канцеростатического действия препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого:

1. 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 [14], 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.

2. Изменение фонда свободных аминокислот плазмы крови посредством регуляции метаболических потоков на уровне транспорта и реакций промежуточного обмена этого класса соединений, а так же действия на функциональное состояние и активность ферментов, участвующих в метаболизме аминокислот и в целом определяющих активность и характер процессов злокачественного роста.

Очевидно, что окончательные выводы могут быть сделаны только на основании исследований плазмы крови, проведенных при применении NSC-631570 по многократно, широко и доказательно обоснованным показаниям в качестве противоопухолевого лекарственного препарата у онкологических больных.

Полученные нами доказательства различного действия 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 NSC-631570 на канцерогенез и дают основание для дальнейших исследований в направлении его применения для диагностики раковой болезни.

Исследование проведено в рамках заданий контракта № 03/03-1К/04 от 15.07.2004 г. с Украинским противораковым институтом (Вена, Австрия). Авторы приносят благодарность за финансовую поддержку директору этого института доктору В. Новицкому.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lubec C., Rosental J.A.* (1990) *Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine)*, Escom., New York.
2. *Nefyodov L.I., Doroshenko E.M., Smirnov V. Yu., Uglyanitsa K.N., Nowicky J.W.* (2003) *Int. J. Immunotherapy*, **19**(2-4), 109-114.
3. *Nefyodov L.I., Uglanica K.N., Smirnov V.Y., Doroshenko Y.M., Fomin K.A., Nowicky J.W., Brzosko W.J.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **22**, 83-86.
4. *Nefyodov L.I., Uglanica K.N., Smirnov V.Y., Doroshenko Y.M., Fomin K.A., Nowicky J.W., Brzosko W.J.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **22**, 87-90.
5. *Nefyodov L.I., Uglyanitsa K.N., Nechiporenko N.A., Smirnov V.Y., Brzosko W., Karavay N.L.* (2000) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **26**(5-6), 195-199.
6. *Nefyodov L.I., Uglyanitsa K.N., Smirnov V.Y., Karavay A.V., Brzosko W.* (2000) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **26**(5-6), 231-237.
7. *Nowicky J.W., Nefyodov L.I., Doroshenko Ye., Karavay A., Glazev A., Nowicky A., Smirnov V., Dorofey D.* (2006) in: *Intern. Symp. Clinical Biomarker Summit*, Coronado, California, USA, p. 25
8. *Nefyodov L.I., Doroshenko E.M., Smirnov V.Yu., Karavay A.V., Nowicky J.W.* (2005) *FEBS J.*, **272**(1), 558.
9. *Liepins A., Nowicky J.W., Bustamante J.O., Lam E.* (1996) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **22**, 1-8.
10. *Winer B.J., Brown D.R., Michels K.M.* (1991) *Statistical principals in experimental design* (3rd ed.), McGraw-Hill, New York.
11. *Montgomery D.C., Runger G.C.* (2002) *Applied Statistics and Probability for Engineers* (3rd ed.), John Wiley & Sons, New York.
12. *Нефёдов Л.И.* (1993) *Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса. Автореф. дисс. докт. наук, БГУ, Минск.*
13. *Маскевич А.А., Смирнов В.Ю., Новицкий Я.* (2006) *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем*, **1**, 287-292.
14. *Пикулев А.Т.* (1969) *Влияние ионизирующего излучения в относительно небольшой дозе на обмен глутаминовой кислоты в животном организме. Автореф. дисс. докт. наук, БГУ, Минск.*

Поступила: 26. 06. 2007.

**CHANGES IN AMINO ACID PATTERNS OF BLOOD PLASMA IN TUMOR PATIENTS WITH ANTICANCER DRUG NSC-631570: POSSIBLE APPROACHES TO CANCER DIAGNOSTICS**

*A. Glazev, L. Nefyodov*

Laboratory of Biochemistry of Biologically Active Substances Yanka Kupala State University of Grodno, Belarus, 52, BLK, Grodno, 230017 Belarus; tel./fax: +375 (152) 48 68 10, tel.: +375 (29) 63 76 982; e-mail: l.nefyodov@grsu.by; www.nil.grsu.by

In our early experimental (with W-256, SM-1 and PC-1 tumors) and clinical (breast, bladder and prostate cancers) studies the use of the anticancer drug NSC-631570 was proven to be safe and highly effective, inhibiting protein synthesis in cancer cells, selectively accumulating in cancer tissue after a single intravenous administration and controlling cancer-induced metabolic imbalance. This drug inhibits metabolic processes in the tumor and causes metabolic disorders in cancer cells. Moreover, NSC-631570 induced the changes in certain amino acids concentrations in biological fluids and tumor tissue in animal models and cancer patients. These changes cannot be explained by metabolic amino acid disorders in cancer known so far. In this study the effects of NSC-631570 on blood plasma amino acids has been investigated.

Blood was sampled from 10 healthy donors and 29 patients with different types of cancer (stomach, rectal, lung, breast, bladder, prostate, and leukemia).

Comparison of NSC-631570 effects in plasma of healthy donors and cancer patients has shown, that this compound: 1) affects amino acids with positively charged (His, Arg) or not charged (Tyr, Thr, Gln) R-groups; 2) decreases concentration of His and increase the concentrations of  $\beta$ -Ala and Tau. These changes depend on the concentration of NSC-631570 and the type of cancer. On the basis of the literature data and the results of our studies we suggest that Ukrain's® biological actions in cancer are realized at least partly through selective interaction with amino acids, their derivatives, and plasma proteins. These data provide the background for the using Ukrain in the cancer detection and investigating the mechanisms of carcinogenesis.

**Key words:** amino acids, anticancer effects, NSC-631570, cancer diagnostics.