



УДК 577.127:576.385

© 2010

Академик НАН України С. В. Комисаренко, Н. П. Дмитренко,
Т. О. Кишко, Н. Н. Великий

Формальдегид уменьшает цитотоксическое действие азидотимидина на тимоциты крыс

У досліджах in vitro на тимоцитах досліджено вплив формальдегиду, його можливих донорів (тіопроліну, форміату, уротропіну) та акцептора формальдегиду — димедону на індуквану азидотимідином загибель клітин. Показано, що в умовах токсичної дії азидотимідину на тимоцити формальдегид і тіопролін (меншою мірою форміат й уротропін) у малих нетоксичних для клітин концентраціях проявляють істотну цитопротекторну дію, що знімається димедоном.

Азидотимидин (3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин, или АЗТ) более 20-ти лет широко используется в химиотерапии больных СПИДом в качестве одного из нуклеозидных аналогов ингибиторов обратной транскриптазы (NRTIs). При длительном лечении АЗТ, как и NRTIs более нового поколения, возникают значительные побочные эффекты, охватывающие широкий спектр патологических изменений в организме и ограничивающие дозы и длительность применения этих препаратов. Основное побочное действие АЗТ, которое приводит к угнетению функции костного мозга (анемия и нейтропения; тромбоцитопения, гематомегалия), отмечается уже после 6-ти месяцев приема препарата и связано с его высокой цитотоксичностью. В опытах *in vitro* показано, что действующие как анти-ВИЧ дозы АЗТ являются высокотоксичными и в отношении клеток организма [1]. Исчезновение проявлений цитотоксичности после прекращения приема АЗТ подтверждает, что они не являются симптомами СПИДа, а связаны с употреблением лекарственного препарата. Цитотоксическое действие АЗТ является дозозависимым и развивается, судя по характерным морфологическим и биохимическим признакам, по типу апоптоза. Например, АЗТ вызывает двунитевые разрывы, межнуклеосомную фрагментацию DNA, активацию ядерных Ca²⁺-, Mg²⁺-зависимых эндонуклеаз и PARP, образование апоптических телец в клетках мышечной лимфомы линии Sp2/0 [2]. В клетках лимфомы Баркетта АЗТ индуцирует апоптоз через высвобождение из под контроля лигандом рецептора смерти CD95L и активацию каспазы-3 [3]. В качестве триггерных механизмов индуцируемого АЗТ апоптоза рассматривают митохондриальную дисфункцию и оксидативный стресс. Повреждение митохондрий

АЗТ может осуществляться прямым и быстрым влиянием на активность митохондриальных ферментов, в частности дыхательной цепи митохондрий и цикла Крепса, или же более длительным путем — через изменение mtDNA и последующее нарушение биосинтеза белков в митохондриях. АЗТ, как и другие нуклеозидные аналоги, легко транспортируются в митохондрии соответствующим переносчиком [4]. Нарушение в структуре mtDNA осуществляется АЗТ через ингибирование ДНК-полимеразы γ и фосфорирования тимидина в ТТФ. Цитотоксическое действие АЗТ сопровождается также и оксидативным повреждением mtDNA с образованием 8-охо-7,8-дегидро-2'-дезоксигуанозина. Кроме того, показано, что АЗТ избирательно ингибирует цитохромоксидазную, сукцинат-цитохром-*c*-редуктазную и цитратсинтазную активности, вследствие чего уменьшается внутриклеточный уровень АТФ, а также компенсаторно усиливается гликолиз и продукция лактата [5–7]. Уменьшение активности цитохромоксидазы при длительном приеме АЗТ является настолько постоянным явлением, что может служить биомаркером индуцируемой АЗТ митохондриальной токсичности.

Имеются основания предполагать, что проапоптотическое действие АЗТ, в том числе и вовлекающее в этот процесс митохондрии, обусловлено развитием оксидативного стресса. У животных, получавших АЗТ, в миокарде отмечается значительное возрастание ROS и пероксинитрита, активация ПОЛ, карбонилирование клеточных белков и увеличение количества окисленного глутатиона. Введение в рацион повышенных доз витаминов E и C предохраняет от индуцированного АЗТ оксидативного повреждения митохондрий скелетных мышц [8, 9]. Однако эффективность использования указанных антиоксидантов оказалась значительно меньшей, чем можно было бы ожидать, исходя из ключевой роли оксидативного стресса в патогенезе индуцированных АЗТ осложнений.

В поиске средств, более эффективно противодействующих этим осложнениям, наше внимание привлек формальдегид. Последний не только образуется в процессе клеточного метаболизма, но и является его регулятором [10]. Есть данные о защитном действии формальдегида в близких к физиологическим концентрациях при консервации тканей, а также на клетки миокарда и головного мозга при ишемических состояниях [10, 11].

В опытах *in vitro* на тимоцитах крысы исследовалось влияние формальдегида и некоторых соединений, влияющих на его обмен (тиопролин, уротропин, формиат и димедон), на индуцированную АЗТ гибель клеток.

Методы исследования. После декапитации у животных удаляли тимус и помещали его в раствор Хенкса с 10 мм *трис*-HCl (pH 7,3). Тимоциты получали посредством мягкого протирания и промывания ткани тимуса питательной средой через капроновую сетку. Клетки 2 раза промывали тем же раствором с последующим центрифугированием (1000 g, 10 мин).

Полученную в среде Хенкса суспензию тимоцитов ($2 \cdot 10^7$ клеток) разливали по 100 мкл в 96-луночные пластиковые планшеты, куда затем добавляли исследуемые соединения и доводили объем до 200 мкл. Инкубировали при 37 °C в течение 7 ч. Подсчет количества живых и погибших клеток проводили через каждый час инкубации в камере Горяева после обработки их трипановым синим.

Количество клеток в 1 мл суспензии (x) определяли по формуле $x = A \cdot 250 \cdot 1000 \cdot B$, где A — количество клеток в большом квадрате камеры Горяева; B — степень разведения клеточной суспензии. Данные рис. 1–4 отражают средние величины 4–6 опытов.

Результаты и их обсуждение. Согласно данным, представленным на рисунках, можно утверждать, что в присутствии 8 ммоль/л АЗТ через 7 ч инкубации тимоцитов гиб-

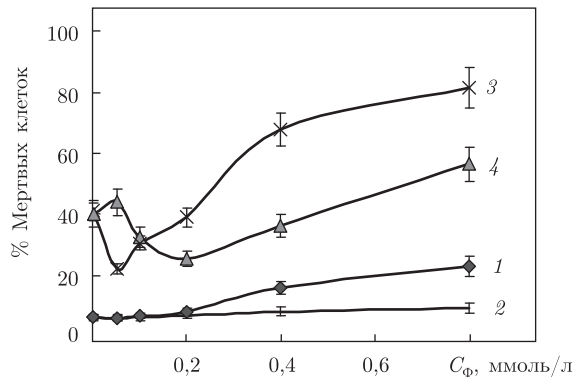


Рис. 1. Влияние формальдегида (Ф) и димедона (Д) на вызываемую азидотимидином (АЗТ) гибель тимоцитов:
 1 — Ф; 2 — Ф + 1 ммоль/л Д; 3 — 8 ммоль/л АЗТ + Ф; 4 — 8 ммоль/л АЗТ + Ф + 1 ммоль/л Д

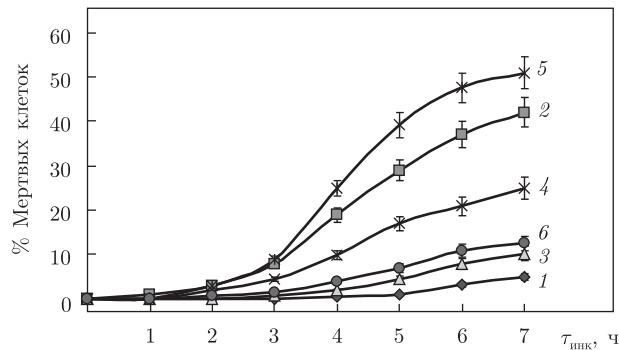


Рис. 2. Зависимость гибели тимоцитов от времени инкубации при действии азидотимидина (АЗТ), тиопролина (Т) и димедона (Д):
 1 — без эффектора; 2 — 8 ммоль/л АЗТ; 3 — 1 ммоль/л Т; 4 — АЗТ + Т; 5 — АЗТ + Т + 1 ммоль/л Д; 6 — 1 ммоль/л Д

нет около 40% клеток. Эти концентрации соразмерны с дозами LD 50 для крыс (около 1500 мг/кг при интраперитонеальном введении) [12]. Если учесть молекулярную массу АЗТ (267,2 к. д.) и предположить равномерное распределение препарата в теле животного, то его концентрация может составлять 5,6 ммоль/л. Но в организме есть малодоступные для препарата ткани, и потому его действующие концентрации должны быть значительно большими.

Формальдегид в концентрациях, превышающих 0,2 ммоль/л, оказывает на тимоциты дозозависимое цитотоксическое действие, которое устраняется димедоном (кривая 2 на рис. 1). Последнее обусловлено способностью димедона весьма эффективно связывать формальдегид с образованием формалдимедона [13]. Влияние формальдегида на индуцируемую АЗТ гибель тимоцитов неоднозначно (кривая 3 на рис. 1). При нетоксической для тимоцитов концентрации (0,05 ммоль/л) формальдегид значительно (на 46,5%) снижает число погибших клеток. С повышением концентрации формальдегида его цитопротекторный эффект уменьшается, а при цитотоксических концентрациях (0,4 ммоль/л и выше) он потенцирует токсическое действие АЗТ на тимоциты. Присутствие в среде инкубации тимоцитов димедона значительно снижает как цитопротекторное, так и усиливающее цитотоксическое действие формальдегида в отношении АЗТ.

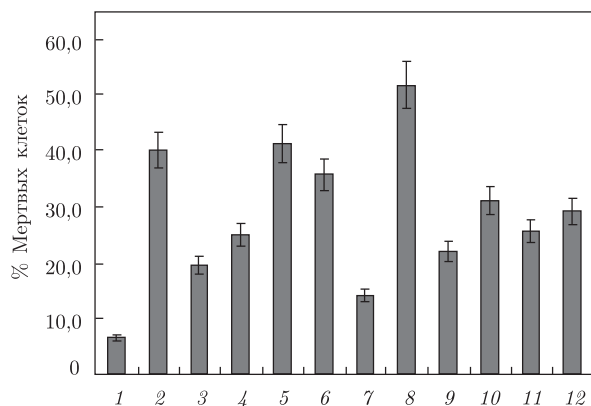


Рис. 3. Влияние тиопролина (Т), ацетилцистеина (АЦЦ) и формальдегида (Ф) на вызываемую азидотимидином (АЗТ) гибель тимоцитов:

1 – без эффектора; 2 – АЗТ 8 ммоль/л; 3 – АЗТ 8 ммоль/л + Т 0,5 ммоль/л; 4 – АЗТ 8 ммоль/л + Т 1 ммоль/л; 5 – АЗТ 8 ммоль/л + АЦЦ 0,5 ммоль/л; 6 – АЗТ 8 ммоль/л + АЦЦ 1 ммоль/л; 7 – АЗТ 8 ммоль/л + Т 0,5 ммоль/л + АЦЦ 0,5 ммоль/л; 8 – АЗТ 8 ммоль/л + Т 0,5 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л; 9 – АЗТ 8 ммоль/л + Ф 0,25 ммоль/л; 10 – АЗТ 8 ммоль/л + Ф 0,5 ммоль/л; 11 – АЗТ 8 ммоль/л + Ф 0,25 ммоль/л + АЦЦ 0,5 ммоль/л; 12 – АЗТ 8 ммоль/л + Ф 0,5 ммоль/л + АЦЦ 0,5 ммоль/л.

Величины (% мертвых клеток) контролей с эффекторами не превышают контроль при их отсутствии: Т 0,5 ммоль/л ($6,5 \pm 0,7$); Т 1 ммоль/л ($9,9 \pm 2,2$); АЦЦ 0,5 ммоль/л ($7,6 \pm 1,2$); АЦЦ 1 ммоль/л ($7,0 \pm 1,4$); АЦЦ 0,5 ммоль/л + Т 0,5 ($6,5 \pm 1,2$); Д 0,5 ($6,0 \pm 0,8$); Ф 0,025 ($5,5 \pm 0,5$); Ф 0,05 ($5,5 \pm 0,4$); Ф 0,025 ммоль/л + Д 0,5 ($5,9 \pm 0,5$); Ф 0,05 ммоль/л + Д 0,5 ($6,1 \pm 0,3$)

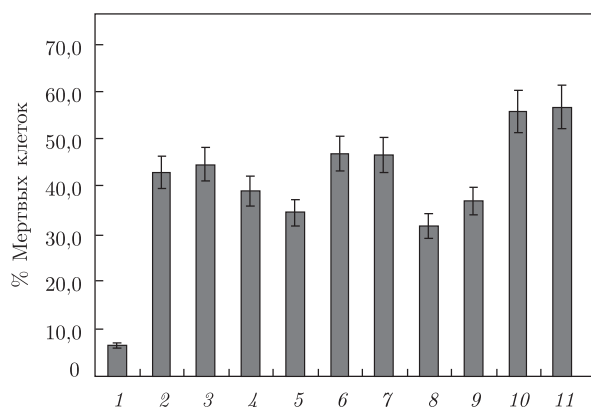


Рис. 4. Влияние формиата (Фрт) и уротропина (Ур) на вызываемую азидотимидином (АЗТ) гибель тимоцитов:

1 – без эффектора; 2 – АЗТ 8 ммоль/л; 3 – АЗТ 8 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л; 4 – АЗТ 8 ммоль/л + Фрт 2 ммоль/л; 5 – АЗТ 8 ммоль/л + Фрт 4 ммоль/л; 6 – АЗТ 8 ммоль/л + Фрт 2 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л; 7 – АЗТ 8 ммоль/л + Фрт 4 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л; 8 – АЗТ 8 ммоль/л + Ур 0,5 ммоль/л; 9 – АЗТ 8 ммоль/л + Ур 1 ммоль/л; 10 – АЗТ 8 ммоль/л + Ур 0,5 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л; 11 – АЗТ 8 ммоль/л + Ур 1 ммоль/л + Д 0,5 ммоль/л.

Величины (% мертвых клеток) контролей с эффекторами не превышают контроль при их отсутствии: Ур 0,5 ммоль/л ($5,7 \pm 0,8$); Ур 1 ммоль/л ($5,7 \pm 0,4$); Ур 0,5 ммоль/л + Д 0,5 ($6,1 \pm 1,0$); Ур 1 ммоль/л + Д 0,5 ($6,3 \pm 0,4$); Д 0,5 ммоль/л ($6,0 \pm 0,8$); Фрт 2 ммоль/л ($6,7 \pm 0,5$); Фрт 4 ммоль/л ($8,0 \pm 0,5$); Фрт 2 ммоль/л + Д 0,5 ($7,0 \pm 0,2$); Фрт 4 ммоль/л + Д 0,5 ($6,6 \pm 0,4$)

Тиопролин (2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid) в концентрациях 0,5 и 1,0 ммоль/л также снижает смертность тимоцитов, обусловленную действием АЗТ на 52 и 39%. Присутствие в среде инкубации тимоцитов димедона не только устраняло цитопротекторное действие

тиопролина, но даже усиливало токсическое действие АЗТ на тимоциты (см. рис. 2; 3). Отсюда можно предположить, что защитное действие тиопролина по отношению к тимоцитам при токсическом влиянии АЗТ в значительной степени обусловлено образующимся из него формальдегидом. А димедон (в нетоксических концентрациях) в присутствии АЗТ и тиопролина оказывает сенсibiliзирующее действие. Это может быть связано с образованием из димедона формальдегида и цитотоксичного формалдимедона. Данные в отношении продуктов катаболизма тиопролина противоречивы. Согласно одним из них, тиопролин окисляется в митохондриях L-пролиндегидрогеназой в формолцистеин, который затем в цитозоле превращается в цистеин и формиат, а, согласно другим, — в процессе катаболизма из тиопролина, кроме цистеина, высвобождается и формальдегид [14]. Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу того, что тиопролин является эндогенным донором формальдегида, что и обуславливает его цитопротекторное действие.

Кривые гибели тимоцитов при раздельном и комбинированном действии АЗТ, тиопролина и димедона в зависимости от времени их инкубации (см. рис. 2) близки к сигмоидальному типу с характерным, предшествующим началу гибели клеток, латентным периодом. Тиопролин в качестве легко проникающего в клетки источника цистеина является предшественником синтеза глутатиона, увеличивает его внутриклеточное содержание и тем самым оказывает антиоксидантное действие. Поскольку по сравнению с цистеином стабильность L-тиопролина в водных растворах значительно выше, его использование как фармпрепарата, диетической добавки к пище или при парентеральном питании считается предпочтительным. Недавно синтезированы производные тиопролина, показавшие высокую анти-HIV-1/Va-L активность [15].

Кроме тиопролина, как внутриклеточный источник цистеина для синтеза глутатиона и антиоксидантной защиты успешно используются N-ацетилцистеин, который легко проникает в клетки и расщепляется N-диацетилазой. Ацетилцистеин сам по себе в сходных с тиопролином концентрациях не проявлял существенного, относительно АЗТ индуцируемой гибели клеток, защитного эффекта, но в комбинации с тиопролином несколько усиливал цитопротекторное действие последнего предположительно за счет антиоксидантных свойств образующегося из него цистеина (см. рис. 3). Ацетилцистеин на цитопротекторное действие формальдегида существенного влияния не оказывал возможно потому, что в тимоцитах не происходит образование тиопролина из этих соединений в достаточных (чтобы вызвать изменения выживаемости клеток) концентрациях. При анализе полученных данных следует также учитывать, что экзогенный формальдегид проникает в клетку извне. Из донора образуется формальдегид, который высвобождается уже в тех или иных компартментах клетки.

Влияние на индуцируемую АЗТ гибель тимоцитов других потенциальных доноров формальдегида — формиата и уротропина иллюстрирует рис. 4. Формиат как донор формальдегида включается в фолатный цикл метаболизма, при функционировании которого частично высвобождается формальдегид [12], а уротропин при кислых значениях pH неферментативно разлагается с высвобождением формальдегида и аммиака. Из рисунка видно, что оба эти соединения в недействующих на клетки концентрациях снижают цитотоксическое влияние АЗТ, а димедон их защитное действие устраняет.

Таким образом, полученные в опытах *in vitro* на тимоцитах данные указывают на то, что формальдегид и некоторые доноры формальдегида, которые высвобождают его внутриклеточно, в нетоксичных для тимоцитов концентрациях способствуют их выживаемости при цитотоксическом воздействии АЗТ.

1. Chiu D. T., Duesberg P. H. The toxicity of azidothymidine (A3T) on human and animal cells in culture at concentrations used for antiviral therapy // *Genetica*. – 1995. – **95**, No 1–3. – P. 103–109.
2. Sailaja G., Nayak R., Antony A. Azidothymidine induces apoptosis in mouse myeloma cell line Sp2/0 // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. – **52**, No 6. – P. 857–862.
3. Lee R. K., Cai J.-P., Deyev V. et al. Azidothymidine and Interferon- α Induce Apoptosis in Herpesvirus-associated Lymphomas // *Cancer Research*. – 1999. – **59**, No 1. – P. 5514–5520.
4. Dolce V., Fiermonte G., Runswick M. J. et al. The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**, No 5. – P. 2284–2288.
5. Lynx M. D., McKee E. E. 3-Azido-3-deoxythymidine (AZT) is a competitive inhibitor of thymidine phosphorylation in isolated rat heart and liver mitochondria // *Biochem. Pharmacol.* – 2006. – **72**. – P. 239–243.
6. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a Pharmacological Target // *Pharmacological Reviews*. – 2002. – **54**, No 1. – P. 101–127.
7. Lewis L. D., Amin S., Civin C. I., Lietman P. S. Ex vivo zidovudine (A3T) treatment of CD34+ bone marrow progenitors causes decreased steady state mitochondrial DNA (mtDNA) and increased lactate production // *Human and Experimental Toxicol.* – 2004. – **23**, No 4. – P. 173–185.
8. Scruggs E. R., Dirks A. J. Naylor Mechanisms of Zidovudine-Induced Mitochondrial Toxicity and Myopathy // *Pharmacology*. – 2008. – **82**. – P. 83–88.
9. De la Asuncion J. G., del Olmo M. L., Sastre J. et al. A3T treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. Prevention by antioxidant vitamins // *Clin. Invest.* – 1998. – **102**, No 1. – P. 4–9.
10. Дмитренко Н. П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 1. Экзо- и эндогенные источники формальдегида и оксида азота. Токсическое действие формальдегида // *Укр. биохим. журн.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 38–47.
11. Кованов В. В., Андреева Н. А., Ляпкина Е. И. Значение взаимосвязи фолиевой кислоты и формальдегида в жизненно важных процессах в организме // *Вестн. АМН СССР*. – 1989. – **3**. – С. 84–90.
12. Zhang R., Lu Z., Diasio C. R. et al. The time of administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine (A3T) determines its host toxicity with possible relevance to A3T chemotherapy // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1993. – **37**, No 9. – P. 1771–1776.
13. Rozyo T. K., Siemba R., Tyhak E. Measurement of formaldehyde as dimedone adduct and potential formaldehyde precursors in hard tissues of human teeth by overpressured layer chromatography // *Biomed. Chromatogr.* – 1999. – **13**, No 8. – P. 513–515.
14. Buhler S., Wagner K., Bössler K. H. Metabolism of L-thiazolidine – 4-carboxylic acid // *Infusionstherapie*. – 1989. – **16**, No 2. – P. 82–86.
15. Oiry J., Puy J. Y., Mialocq P. et al. Synthesis and in vitro anti-HIV activity in human monocyte-derived macrophages of 2-oxothiazolidine – 4(R)-carboxylic acid derivatives // *J. Med. Chem.* – 1999. – **42**. – P. 4733–4740.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 30.12.2009

Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko, M. P. Dmitrenko,
T. O. Kishko, M. M. Velykey**

Formaldehyde decreases azidothymidine toxic action on rat's thymocytes

The influence of formaldehyde, its donors (thioprolin, formate, urotropine) and its acceptor dimedone on the azidothymidine cytotoxic action on rat's thymocytes in in vitro experiments is investigated. The results show the cytoprotector effect of formaldehyde and thioprolin (to a lesser extent, that of formic acid and urotropine) in concentrations nontoxic for cells. These effects are diminished by the adding of dimedone that indicates the key role of formaldehyde in the cytoprotective action.