Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա. Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении, Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia. Biological Journal of Armenia

Биолог. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 577.1.616-006.3.04

МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА ПРИ САРКОМЕ-45 И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ 2-ЦИАН-3,4,4-ТРИМЕТИЛ-2-БУТЕН-4-ОЛИДА

А.С. КАРАГУЛЯН, А.А. АСОЯН, П.А. КАЗАРЯН, А.А. АВЕТИСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра органической химии, 0049

Установлено, что саркома-45 приводит к значительным изменениям фосфолипидного спектра мембран тимоцитов и спленоцитов у крыс. Применение производного бутенолида сопровождается определенной нормализацией количественного и качественного состава фосфолипидов, фосфолипидных соотношений в ткани селезенки и тимуса. Следовательно, производное бутенолида обладает определенным мембраностабилизирующим свойством.

Հաստատվել է, որ առնետների մոտ սարկոմա-45 բերում է սպլենոցիտների և տիմոցիտների բաղանթների ֆոսֆոլիպիդային սպեկտրի զգալի տեղաշարժերի: Բութենոլիդի ածանցյալի օգտագործումը սարկոմա-45 ժամանակ ուղեկցվում է ուրցագեղձի և փայծաղի հյուսվածքների ֆոսֆոլիպիդների որակական և քանակական բաղադրության, ֆոսֆոլիպիդային հարաբերակցությունների որոշակի կարգավորմամբ: Հետևաբար, բութենոլիդի ածանցյալն օժտված է որոշակի թաղանթակայունացնող հատկությամբ:

It has been established that sarcoma-45 causes the significant shifts of membrane phospholipids spectrum in a thymocyte and splenocyte at rats. The application of derivative of butenolid at sarcoma-45 is accompanied by the certain regulation at quantitative and qualitative composition of phospholipids and phospholipid-phospholipids ratio in thymus and spleen tissues. Hence, derivative of butenolid has certain membrane-stabilizing property.

Саркома-45 - мембрана - фосфолипиды - 3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида

Проблема создания и совершенствования методов диагностики, а также и выскания биологически активных веществ, обладающих противоопухолевой активностью, продолжает оставаться одной из актуальных задач клинической биохимии, онкологии и фармакологии. С этой точки зрения определенный интерес представляет поиск новых противоопухолевых средств среди производных ненасыщенных пятичленных лактонов, многие представители которых обладают определенным канцеростатическим и канцеролитическим действием [1, 2, 5].

Первостепенной задачей изучения новых медикаментозных средств является прежде всего выяснение молекулярных механизмов поражения организма при опухолевом росте [5].

Согласно литературным данным, обязательным признаком для любого злокачественного новообразования является системное действие опухоли на отдаленные ткани и эндокринные железы, ведущее к состоянию

иммунодепрессии, нарушению гомеостаза организма. В то же время установлено, что одним из морфофункциональных локусов, вовлекаемых в механизмы канцерогенеза различной этиологии, является клеточная мембрана, в молекулярной организации и функционировании которой важная роль отводится фосфолипидам (ФЛ) [5, 8, 15].

Поскольку иммунный статус является одним из маркеров опухолевого роста, для выяснения механизмов действия нового производного ненасыщенных пятичленных лактонов, а именно 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида, синтезированного на кафедре органической химии ЕГУ и обладающего определенной биологической активностью [1], стало целесообразным изучение клеток лимфоидной ткани селезенки и тимуса у крыс с саркомой-45 путем исследования количественно-качественного состава мембранных ФЛ до и после применения указанного соединения.

Материал и методика. Опыты проводили на 40 беспородных белых крысах самцах массой 140–160г. Подопытные животные были разделены на 3 группы. В первую контрольную группу входили 16 интактных, а во вторую и третью по 12 животных, которым привили штамм саркомы-45 [6]. Прививку проводили в стерильных условиях в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии ИТОХ НАН РА. Штамм саркомы-45 был получен из опухолевого банка Онкологического научного центра МЗ РФ (Москва). Начиная с 4-го дня прививки, животным третьей группы ежедневно в течение 8 дней вводили 2-циан-3,4,4-триметил-2 бутен-4-олид (в виде крахмального раствора) в дозе 17,5 мг/кг.

Животных забивали на 15 сут эксперимента методом декапитации. В исследованиях использовались мембраны, полученные методом дифференциального центрифугирования [11]. Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля марки ЛС/40 мк [4]. Идентификацию ФЛ проводили с помощью свидетелей фирмы Sigma, а также по величинам Rf. В каждой фракции определяли содержание липидного фосфора при длине волны 815 нм [7]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Согласно результатам проведенных исследований, у крыс с саркомой-45 наблюдаются однонаправленные изменения относительного содержания мембранных фосфатидов-глицеридов в ткани тимуса и селезенки при наличии отчетливых межфракционных изменений со стороны индивидуальных ФЛ.

Как показывают данные, приведенные на рис.1 и 2, при саркоме-45 наблюдается более чем двукратное снижение уровня диненасыщенных фосфатидилхолинов (ФХ), составляющих доминирующую массу всех субклеточных фракций ФЛ. Одновременно отмечается статистически достоверное повышение ($p<0,05$; $p<0,001$) процентного содержания мембранолитических лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), что в свою очередь может привести к нарушению иммунорегуляторных процессов [12]. Причем, накопление этого цитотоксичного продукта в селезеночной ткани более выражено по сравнению с таковым в ткани тимуса. На этом фоне необходимо отметить также различия и в направленности изменения концентрации фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), а именно в селезеночной ткани их содержание увеличивается почти в 1,5 раза, тогда как в ткани тимуса, наоборот, почти однозначно снижается. Исходя из этих данных, можно предположить, что в

селезеночной ткани ФХ легче подвергаются действию фосфолипаз (главным образом A_1, A_2) с выходом значительного количества ЛФХ, а в ткани тимуса отмечается сдвиг в сторону реакции трансметилирования ФХ в ФЭ.

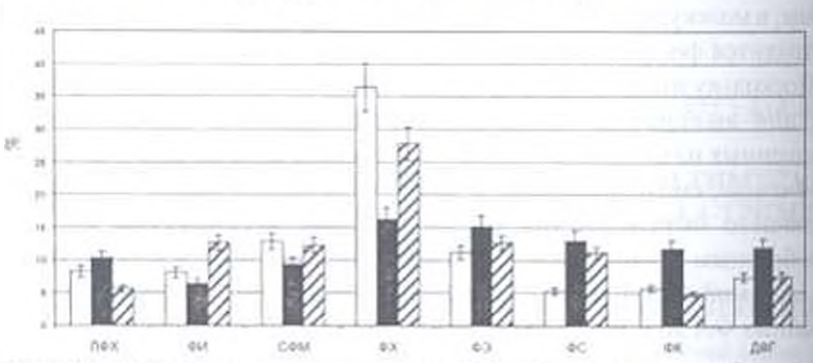

Рис. 1. Относительное содержание индивидуальных ФЛ мембран клеток тимуса при саркоме-45 и после применения 2-циано, 3,4,4-триметил, 2-бутен-4-олида, % от суммы

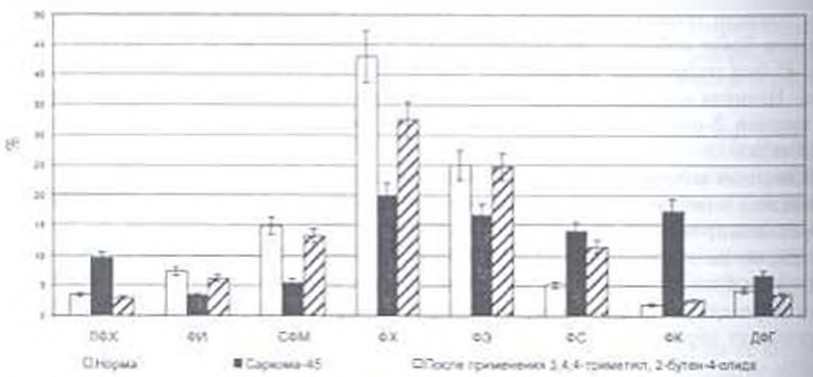

Рис. 2. Относительное содержание индивидуальных ФЛ мембран клеток селезенки при саркоме-45 и после применения 3,4,4-триметил, 2-бутен-4-олида, % от суммы.

Параллельно снижению уровня ФХ наблюдается явно выраженное (более 2,5 раз) накопление фосфатидилсеринов (ФС), что характеризует резкое ингибирование процессов декарбоксилирования. Эти данные позволяют сделать предположение о нарушении процессов как взаимопревращения, так и синтеза ФЛ. Изменение в распределении ФС, играющих важную роль в координации деятельности некоторых мембранных белков, могут привести к нарушению сигнальной трансдукции и апоптозу клетки [10, 13]. На замедление, а, возможно, и полное подавление биосинтетических процессов у животных с саркомой-45 указывает и накопление фосфатидных кислот (ФК), являющихся одним из промежуточных продуктов биосинтеза фосфатидов-глицеридов.

Примечательно, что наряду с ФХ, снижается и концентрация сфингомиелинов (СФМ). И те, и другие локализованы в наружном слое мембран, принимая активное участие в поддержании барьерной функции последних. Эти данные являются свидетельством глубокого поражения поверхностного липидного слоя, которое может привести к развитию

деструктивных процессов в мембранах исследуемых клеток. В последнее время СФМ отводится также роль вторичных мессенджеров трансдукции внешнего сигнала к клетке, им придается особое значение в процессах межклеточного взаимодействия, регуляции роста, дифференциации и апоптоза клеток, особенно при опухолевом росте [9].

На этом фоне отмечается почти 62%-ное увеличение содержания дифосфатидилглицеридов (ДФГ) в ткани селезенки и тимуса.

В этих условиях отмечается статистически достоверное снижение уровня монофосфоинозитидов (МФИ), что может быть связано с нарушением энергетической стабильности в клетках. Известно, что одним из интересных аспектов физиологической роли обмена фосфоинозитидов (ФИ) является их участие в трансформации энергии в клетке. Трифосфатидилинозитид может выполнять функции как посредника в использовании энергии АТФ, так и предшественника его синтеза. При этом имеются данные о существовании связи между АТФ-синтезирующей функцией дыхательной цепи митохондрий и уровнем МФИ. ФИ, наряду с циклическими нуклеотидами, выполняют роль вторичных мессенджеров, участвуя в регуляции клеточного метаболизма за счет мобилизации Ca^{2+} и активации аденилат-гуанилатциклаз [3].

Резюмируя данные нарушения количественного состава ФЛ при саркоме-45, необходимо констатировать тот факт, что в исследуемых тканях наблюдаются изменения концентрации всех фракций фосфатидов-глицеридов, причем в селезеночной ткани отмеченные сдвиги более выражены по сравнению с таковыми в ткани тимуса.

Нет сомнений, что описанные существенные сдвиги фосфолипидного состава могут привести к изменению филогенетически сложившегося постоянства их соотношений, ведущему к серьезным нарушениям жизненно важных физиологических функций клетки.

Согласно данным табл. 1 и 2, при саркоме-45 в ткани тимуса и селезенки отмечается резкое увеличение (соответственно на 64,3% и 124%) суммы кислых ФЛ (КФЛ) на фоне статистически достоверного увеличения (на 25,8% и 40,4%) суммы нейтральных липидов (НФЛ).В результате этого наблюдается выраженное понижение величины коэффициента соотношения НФЛ/КФЛ. При этом отмеченное выше резкое падение уровня ФХ, составляющих основную массу ФЛ мембран, обуславливает двадцатикратное снижение коэффициента соотношения ФХ/ФК на фоне шестикратного увеличения величины ФХ/ЛФХ в ткани селезенки. Эти сдвиги в ткани тимуса менее заметны и соответствуют четырех- и трехкратному изменению данных коэффициентов. Полученные результаты указывают на подавление процессов биосинтеза фосфатидов-глицеридов из ФК, сопровождающихся активированием процессов деградации этих соединений при саркоме-45, а именно фосфолипазного гидролиза и перекисного окисления мембранных липидов. В этих условиях наблюдается статистически достоверное снижение показателя соотношения суммы холинсодержащих (ФХ и СФМ) и суммы аминсодержащих (ФЭ и ФС) ФЛ внутреннего слоя, что происходит

преимущественно за счет выраженного понижения холинсодержащих фосфолипидов, локализованных в наружном слое мембраны.

Таблица 1. **Изменение фосфолипид-фосфолипидных соотношений в ткани селезенки при саркоме-45 и после введения соединения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида**

ФЛ/ФЛ соотношения	Контроль n=15	Саркома-45 n=11	После введения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида n=11
НФЛ (ЛФХ+СФМ+ФХ+ФЭ)	86,53	51,60	73,60
КФЛ (ФИ+ФС ФК+ ДФГ)	18,56	41,58	23,75
Холинсодержащие ФЛ (СФМ+ ФХ)	58,00	25,26	45,80
Аминсодержащие ФЛ (ФЭ+ФС)	30,07	30,81	36,27
ЛФХ/ФХ	0,08	0,48	0,09
ФХ/ФК	22,68	1,14	12,60
ФЭ/ФХ	0,58	0,85	0,76
СФМ/ФХ	0,35	0,27	0,40
НФЛ/КФЛ	4,70	1,24	3,10
Холинсодержащие ФЛ / Аминсодержащие ФЛ	1,93	0,82	1,26

Таблица 2. **Изменение фосфолипид-фосфолипидных соотношений в ткани тимуса при саркоме-45 и после введения соединения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида**

ФЛ/ФЛ соотношения	Контроль n=15	Саркома-45 n=11	После введения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида n=11
НФЛ (ЛФХ+СФМ+ФХ+ФЭ)	68,64	50,95	58,40
КФЛ (ФИ +ФС ФК+ ДФГ)	26,38	43,33	36,03
Холинсодержащие ФЛ (СФМ+ ФХ)	49,25	25,61	40,10
Аминсодержащие ФЛ (ФЭ+ФС)	16,37	28,16	23,80
ЛФХ/ФХ	0,23	0,63	0,20
ФХ/ФК	6,38	1,38	5,80
ФЭ/ФХ	0,30	0,93	0,46
СФМ/ФХ	0,35	0,58	0,44
НФЛ/КФЛ	2,60	1,17	1,62
Холинсодержащие ФЛ / Аминсодержащие ФЛ	3,01	0,91	1,68

Эти изменения свидетельствуют о возникновении дисбаланса между внутренним и внешним слоями. При этом отмечается факт более глубокого поражения поверхностного липидного слоя мембран по сравнению с внутренним, и особенности в ткани селезенки. Подтверждением этого является и повышение коэффициента соотношения ФЭ/ФХ, играющего очень важную роль в сохранении интактности мембранных структур, а также наблюдается изменение соотношения СФМ/ФХ. По данным некоторых авторов [14], следствием указанных изменений может стать нарушение физических параметров, таких как снижение текучести, повышение микровязкости и деформируемости клеток.

Итак, сопоставление результатов сдвигов ФЛ/ФЛ соотношений в ткани тимуса и селезенки при саркоме-45 дает возможность предположить о развитии в мембранах выраженных патологических изменений, ведущих к серьезным нарушениям их функциональной активности.

Последующие исследования касались изучения действия соединения 2-циан-3,4.4-триметил-2-бутен-4-олида на нарушенные метаболические процессы при саркоме-45. Как показали результаты исследований, после применения указанного соединения в патологически измененных мембранах как клеток тимуса, так и селезенки происходят значительные положительные сдвиги в спектре мембранных ФЛ. Так, воздействие бутенолида приводит почти к полной нормализации концентрации СФМ, ФЭ, ДФГ и ФК. Очень важно отметить резкое снижение уровня ФК, возможно, связанное с вовлечением данного ФЛ в процессы синтеза фосфоглицеридов, подтверждением чему является повышение относительной концентрации ФХ почти в 1,7 раз. Одновременно наблюдается статистически достоверное снижение процентного содержания ФС, свидетельствующее о возможном активировании реакций взаимопревращения ФЭ и ФХ. Примечательно также снижение уровня цитотоксичных ЛФХ ниже контрольных величин, что на фоне увеличения содержания ФХ может стать свидетельством ингибирования процессов распада под воздействием производного бутенолида. При этом содержание ФИ в ткани тимуса повышается выше контрольных величин, что, по всей вероятности, является сигналом активации липидного мессенджерного ответа и признаком возбужденного состояния мембран.

Положительное действие бутенолидов после его применения подтверждается и при анализе данных ФЛ/ФЛ соотношений в ткани тимуса и селезенки. Так, наблюдается более чем трехкратное уменьшение коэффициента соотношения ЛФХ/ФХ с одновременным увеличением величины ФХ/ФК. Отмечается значительное повышение коэффициента соотношения НФЛ/КФЛ за счет увеличения содержания нейтральных и уменьшения кислых ФЛ. Несомненно, указанные положительные сдвиги могут быть как следствием активирующего влияния бутенолидов на биосинтез фосфатидов-глицеридов, в частности ФХ, так и ингибирующего действия на процессы деградации ФЛ. Примечательно, что при этом отмечается факт определенной регуляции соотношения холинсодержащих ФЛ и аминсодержащих, и ФЭ и ФХ. Корригирование указанных коэффициентов,

а также явно выраженная тенденция к нормализации значения СФМ/ФХ могут стать существенной причиной восстановления величин площадей липидных монослоев, а также текучести, микровязкости, жидкостных свойств мембран тимоцитов и спленоцитов.

Таким образом, анализ приведенного экспериментального материала свидетельствует о том, что злокачественный рост сопровождается дезорганизацией мембранных структур ткани селезенки и тимуса. В то же время, исходя из данных состава ФЛ и их соотношений, можно утверждать, что применение соединения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида приводит к значительной стабилизации метаболических процессов, происходящих в исследуемых тканях. Сопоставление полученных данных с данными измерения размеров опухоли при саркоме-45 (до и после применения бутенолида), свидетельствующими о 33-40%-ном уменьшении диаметра опухоли, позволяет считать, что изучаемое соединение обладает определенным антиканцерогенным и мембраностабилизирующим эффектом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г.* Хим. ж. Армении, *46*, 3-4, 219-236, 1993.
2. *Арутюнян В.С., Кочикян Т.В., Аветисян А.А., Кинзирский А.С.* В сб: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины, 409-411, 1998.
3. *Владимиров Ю.А.* Роль нарушений барьерной и матричной функции липидного слоя биологических мембран в патологии. М., 40с., 1998.
4. *Казарян П.А., Элоян Л.В.* Хроматографические методы (распределительная и адсорбционная хроматография). М., Изд-во ЦОЛИУВ, 40с., 1982.
5. *Казарян П.А., Саакян Л.С., Аветисян А.А. и др.* Мат-лы конф. "Современные вопросы онкологии", Ереван,122-123, 2006.
6. *Першин Г.Н.* Методы в экспериментальной химиотерапии. М., Медицина. 364-365,1971.
7. *Светашев В.И.* Автореф. канд. дисс., Владивосток, 25с., 1973.
8. *Deeba F., Tahseen H.N., Sharad K.S. et al* Biochem. Biophys. Acta, May, 1669(2), 170-181, 2005.
9. *Dyatlovitskaya E.V., Bezuglov V.V.* Biochemistry, 63, 1, 2-4, 1998.
10. *Gleiss B., Gogvadze V., Orrenius S., Fadeel B.* FEBS Lett., 519(1-3), 153-158, 2002.
11. *Limber J.R., Davie K.F., Huker A.M.S.* Blood, 36, 2, 111-118, 1970.
12. *Lin P., Ye R.D.* J. Biol. Chem., Apr.18, 278(16), 14379-14386, 2003.
13. *Matsura T., Togawa A., Kai M., et al* Biochem. Biophys. Acta, Oct., 1736(3), 181-188, 2005.
14. *Schlegel R.A., Kemper S., WilliamsoP.J.* Biosci., 15, 3, 187-191, 1990.
15. *Thomas S., Kumar R.S., Brumeanu T.D.,* Arch. Immunol. Ther Exp. (Warsz), Jul-Aug, *52*, 4, 215-224, 2004

Поступила 04.VII.2007