



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

УРОВЕНЬ МЕМБРАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ САРКОМЕ-45 И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЦИАНОСОДЕРЖАЩИХ ЛАКТОНОВ

Г.М. ГАЛОЯН², П.А. КАЗАРЯН^{1,2}

¹ Гематологический центр МЗ РА, 375014

² Ереванский государственный университет

E-mail: gayanegaloyan@rambler.ru

Изучались метаболизм фосфолипидов (ФЛ) и содержание продуктов перекисного окисления липидов при саркоме-45 в эритроцитах и гепатоцитах, а также при введении нового производного цианосодержащих ненасыщенных лактонов. Обнаружен корректирующий эффект указанного соединения, что проявляется уменьшением количества продуктов свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) и стабилизацией липидных компонентов мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45.

Саркома-45- новое производное цианосодержащих лактонов- фосфолипиды- перекисное окисление липидов

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆոլիպիդների (ՖЛ) փոխանակությունը – լիպիդային գերօքսիդացման արգասիքների քանակը երիթրոցիտներում – հեպատոցիտներում սարկոմա-45-ի ժամանակ – ցիան խումբ պարունակող չհագեցած լակտոնների նոր ածանցյալի ներարկումից հետո: Նկատվել է նշված լակտոնի կարգավորող ազդեցությունը, որը դրսևորվում է երիթրոցիտներում – հեպատոցիտներում գերօքսիդացման արգասիքների նվազեցմամբ – թաղանթների լիպիդային բաղադրամասերի կայունացմամբ սարկոմա - 45-ի ժամանակ:

Սարկոմա-45- ցիան խումբ պարունակող չհագեցած լակտոնների նոր ածանցյալ- ֆոսֆոլիպիդներ-լիպիդների գերօքսիդացում

The content of phospholipids (PL) metabolism and lipid peroxidation products in erythrocytes and hepatocytes membranes during the sarcoma-45 and influence of new derivative of cyan containing unsaturated lactones was studied. This study revealed, that lactone have normalizing effect. It is displayed by decreasing of free radicals oxidation level and stabilization of erythrocytes and hepatocytes membranes lipid structures during sarcoma-45.

Sarcoma-45 - new derivative of cyanide lactone – phospholipides - lipid peroxidation

Согласно литературным данным [8], в структуре смертности от злокачественных новообразований более 30% занимают лица в возрасте моложе 60 лет, поэтому большое значение приобретает высокая социальная значимость ранней диагностики, профилактики и лечения онкологических заболеваний.

Результаты [8] исследований свидетельствуют о возрастании распространенности онкологических заболеваний во всем мире, в том числе и в РА.

Характерная особенность развития патологических процессов в организме человека - это существование так называемых порочных кругов, то есть ситуаций, когда одно нарушение влечет за собой другое, которое в свою очередь усиливает первое и т.д. С такой же ситуацией мы сталкиваемся в случае злокачественного роста [2]. Нашими предыдущими исследованиями [10] было доказано, что при саркоме-45 развивается дефицит аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит к разрушению работы насосов, выкачивающих из клетки ионы кальция и натрия [4]. Последнее в свою очередь приводит к активации мембранных фосфолипаз [5].

По данным современной медицины и молекулярной биологии, в механизмах патогенеза многих заболеваний, в том числе и злокачественных новообразований, ведущую роль играют изменения структуры и функции биологических мембран, в частности фосфолипидных компонентов биомембран [7, 14]. Относительно стабильное содержание фосфолипидов (ФЛ) биомембран обеспечивает ее основные регуляторные функции: осуществление процессов окислительного фосфорилирования, свертывания крови, преобразование энергии, трансмембранный перенос веществ, коммуникационную связь клетки с окружением [9, 12].

В связи с вышеизложенным проблема поиска новых потенциально активных фармакологических веществ, обладающих антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, является вполне актуальной.

Цель настоящего исследования – изучение влияния нового производного цианосодержащих лактонов (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид), синтезированного в Ереванском гос.университете, на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) и обмена ФЛ при саркоме-45 в мембранах гепатоцитов и эритроцитов крови.

Материал и методика.

Эксперименты проводились на 37 белых крысах-самцах линии Вистар массой 140-160г, разделенных на три группы. Первая контрольная группа состояла из 15 интактных животных. Животным второй и третьей групп (по 11 крыс в каждой) подкожно перевивали штамм саркомы-45 [11]. Перевивку 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 5-го дня перевивки, после регистрации роста опухоли, животные взвешивались и близкие по массе тела и размерам опухолей разделялись на две группы. Затем подопытным животным третьей группы ежедневно в течение 8 сут вводили 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид (в виде крахмального раствора) в дозе 17,5 мг/кг. Это цианосодержащий ненасыщенный лактон, многие представители которого обладают противоопухолевой активностью [1]. Животных забивали на 15 сут эксперимента методом декапитации, исследуемые органы изолировались в условиях холода (0-4° С). Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом тонкослойной хроматографии в модификации Казаряна П.А. [6, 13] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (Чехия). Для разделения ФЛ использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Липидный фосфор фотометрировали при 815 нм [6]. Об активности ПОЛ судили по количеству конечных молекулярных продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид). В пробах МДА определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [3].

Оптические спектральные измерения проводили на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности.

Результаты и обсуждение.

Изучением спектра ФЛ в мембранах эритроцитов крови и гепатоцитов при саркоме-45 установлены определенные закономерности. При этом наблюдается увеличение содержания цитотоксичных лизофосфатидилхолинов (ЛФХ).

Известно, что существует несколько путей метаболизма ЛФХ, нарушение которых может привести к накоплению фосфатидов-глицеридов. Первой ферментативной реакцией является гидролиз фосфатидилхолинов (ФХ) при участии фосфолипаз A_1 и A_2 , увеличение активности которых может привести к накоплению ЛФХ.

При опухолевых заболеваниях в условиях недостаточности АТФ нарушается активность Na, K-АТФ-аз, в результате чего в клетках накапливаются ионы Ca^{2+} , которые являются активаторами фосфолипаз. Второй причиной накопления ЛФХ в тканях при опухолевых заболеваниях является ингибирование активности лизофосфолипазы, участвующей в превращении ЛФХ в глицерофосфохолин и жирную кислоту.

Заслуживает внимания почти двукратное уменьшение содержания дифосфатидилглицеридов (ДФГ) при саркоме-45 в мембранах эритроцитов крови (табл.1). Известно, что АТФ-АДФ-синтетаза находится в окружении ДФГ. Было установлено, что каждая молекула АТФ-АДФ-синтетазы образует комплекс с шестью молекулами ДФГ [15], и нарушение липидного окружения фермента может привести к изменению его активности. Интересно, что в гепатоцитах, наоборот, содержание ДФГ резко повышается (более 4 раз) (табл.2).

Таблица 1. Изменение относительного содержания индивидуальных ФЛ (ЛФХ, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭ, ФС, ФК и ДФГ) в мембранах эритроцитов (в % от суммы) белых крыс при саркоме-45 и после применения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида

ФЛ	Контроль n=15	Саркома-45 n=11	После применения лактона n=11
ЛФХ	4,3 ± 0,4	14,65 ± 0,85 $P_1 < 0,001$	6,03 ± 0,4 $P_2 < 0,001; P_3 < 0,05$
ФИ	5,8 ± 0,43	12,22 ± 0,74 $P_1 < 0,001$	5,76 ± 0,13 $P_2 < 0,05; P_3 > 0,5$
СФМ	11,2 ± 0,81	5,39 ± 0,43 $P_1 < 0,001$	13,4 ± 0,9 $P_2 < 0,05; P_3 > 0,5$
ФХ	44,1 ± 2,20	18,18 ± 0,8 $P_1 < 0,001$	31,76 ± 1,78 $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФЭ	16,8 ± 1,03	12,40 ± 0,7 $P_1 < 0,01$	25,23 ± 0,9 $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФС	8,2 ± 0,5	16,64 ± 0,9 $P_1 < 0,001$	6,45 ± 0,44 $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФК	2,5 ± 0,18	16,72 ± 0,7 $P_1 < 0,001$	2,38 ± 0,2 $P_2 < 0,001; P_3 > 0,5$
ДФГ	7,2 ± 0,6	3,77 ± 0,24 $P_1 < 0,01$	7,07 ± 0,3 $P_2 < 0,05; P_3 > 0,5$

Примечание:

P_1 – достоверность данных при саркоме-45 по сравнению с контролем

P_2 – достоверность данных после применения препарата по сравнению с данными саркомы-45

P_3 – достоверность данных после применения препарата по сравнению с контролем

Выявлено, что при саркоме-45 и в эритроцитах (табл.1), и в гепатоцитах (табл.2) уменьшается содержание фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ). Известно, что существует взаимосвязь между указанными фосфолипидами и Са-насосом. Установлено, что активность Са-насоса может регулироваться процессом метилирования ФЭ, приводящим к образованию ФХ [15]. С изменением состава мембранных фосфолипидов неразрывно связана также активность ПОЛ.

По нашим данным, саркома-45, как многие другие заболевания, в том числе и опухолевые, сопровождаются активированием процесса ПОЛ, что выражается в увеличении содержания МДА.

Таблица 2. Изменение относительного содержания индивидуальных ФЛ (ЛФХ, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭ, ФС, ФК и ДФГ) в мембранах гепатоцитов (в % от суммы) белых крыс при саркоме-45 и после применения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида

ФЛ	Контроль n=15	Саркома-45 n=11	После применения лактона n=11
ЛФХ	$2,35 \pm 0,39$	$13,13 \pm 0,84$ $P_1 < 0,001$	$4,48 \pm 0,53$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФИ	$5,75 \pm 0,41$	$13,37 \pm 0,86$ $P_1 < 0,001$	$9,88 \pm 0,73$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
СФМ	$9,7 \pm 0,64$	$7,23 \pm 0,5$ $P_1 < 0,05$	$13,23 \pm 0,76$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФХ	$46,3 \pm 2,03$	$15,99 \pm 0,9$ $P_1 < 0,001$	$29,01 \pm 1,7$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФЭ	$24,2 \pm 0,69$	$12,84 \pm 0,7$ $P_1 < 0,01$	$18,04 \pm 1,4$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$
ФС	$6,35 \pm 0,49$	$4,69 \pm 0,55$ $P_1 < 0,02$	$14,37 \pm 0,93$ $P_2 < 0,001; P_3 < 0,01$
ФК	$1,8 \pm 0,19$	$14,25 \pm 1,11$ $P_1 < 0,001$	$3,56 \pm 0,24$ $P_2 < 0,001; P_3 < 0,05$
ДФГ	$3,55 \pm 0,62$	$14,54 \pm 0,95$ $P_1 < 0,001$	$6,52 \pm 0,48$ $P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$

Примечание:

P_1 – достоверность данных при саркоме-45 по сравнению с контролем

P_2 – достоверность данных после применения препарата по сравнению с данными саркомы-45

P_3 – достоверность данных после применения препарата по сравнению с контролем

После применения исследуемого препарата статистически достоверно уменьшается содержание продуктов ПОЛ как в эритроцитах, так и в гепатоцитах (рис. 1 и 2).

Усл.ед.

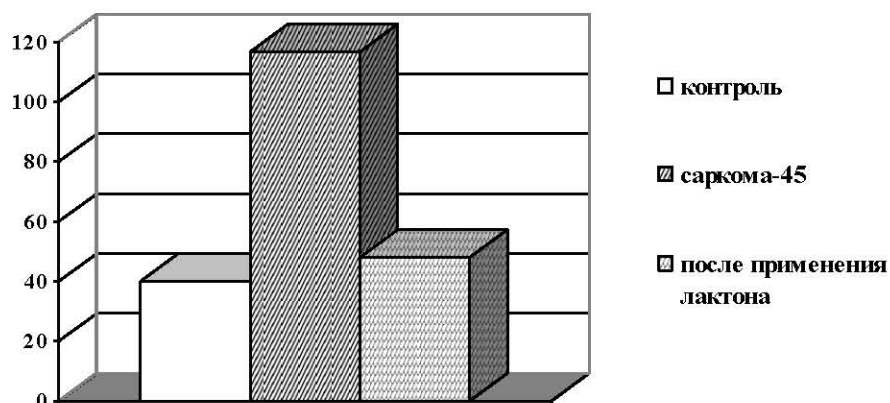


Рис. 1. Активность ПОЛ (усл. ед.) в мембранах эритроцитов при саркоме-45 и после применения лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-олид)

Усл.ед

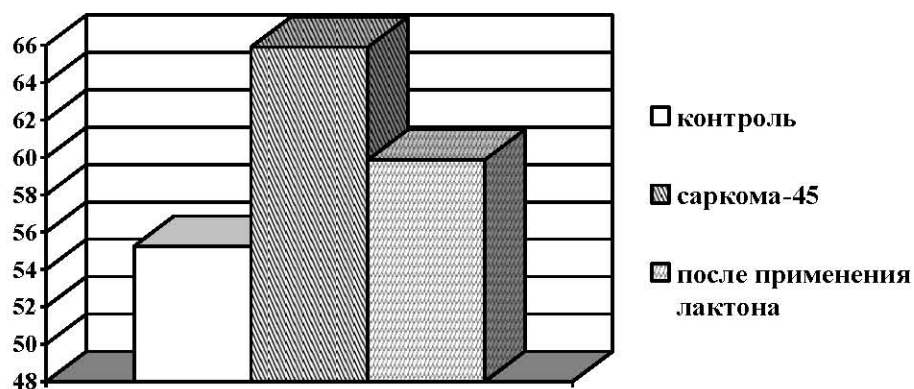


Рис. 2. Активность ПОЛ (усл. ед.) в гепатоцитах при саркоме-45 и после применения лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-олид)

Согласно нашим исследованиям, изученный препарат оказывает антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффекты.

Таким образом, выраженный корригирующий эффект циансодержащего лактона на метаболизм ФЛ и ПОЛ в гепатоцитах и эритроцитах крови указывает на необходимость его дальнейшего целенаправленного исследования при данной патологии.

Список сокращений

Лизофосфатидилхолин - ЛФХ; дифосфатидилглицерид - ДФГ; фосфатидилхолин - ФХ; фосфатидилэтаноламины - ФЭ; фосфатидилинозит - ФИ; сфингомиелин - СФМ; фосфатидилсерин - ФС; фосфатидная кислота - ФК.

Г.М. ГАЛОЯН, П.А. КАЗАРЯН

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г.* Биологически активные производные 2-бутен- и 3-бутен-4-олидов. Хим. ж. Армении, 46(3-4), 219-236, 1993.
2. *Владимиров Ю.А.* Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки, Соросовский образовательный журнал, 6(9), стр.2-9, 2000.
3. *Зубер В.Л.* Методы биохимических исследований, изд-во ЛГУ, стр.74-87. Л., 1982.
4. *Казарян П.А., Галоян Г.М.* Изучение транспортных АТФазных систем плазматических мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45 и после применения нового производного цианосодержащих лактонов // Доклады Академии наук Армении, 114 (1), стр.58-63, 2014.
5. *Казарян П.А., Галоян Г.М., Аветисян А.А., Казарян А.П., Мурадян Р.Е.* Регуляция процессов распада фосфатидов-глицеридов под действием ненасыщенного лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида) при саркоме-45 // Вестник МАНЭБ, 11(8, вып. 2), стр.261-265, 2006.
6. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы. М., ЦОЛИУВ, 50с., 1982.
7. *Казарян П.А., Егиазарян К.В.* Новое в гематологии и трансфузиологии. // стр. 174-179, Киев, 2007.
8. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году // 232с., 2013.
9. *Кренс Б.М.* Липиды клеточных мембран. Наука, Л. стр. 21-40, 1981.
10. *Пепанян А.А., Казарян П.А., Аветисян А.А., Галоян Г.М. и др.* Уровень адениннуклеотидов в некоторых тканях и эритроцитах крови при саркоме-45 до и после применения цианосодержащего лактона в эксперименте // Новое в гематологии и трансфузиологии, стр. 112-120, Киев, 2007.
11. *Перишин Г.Н.* Методы в экспериментальной химиотерапии. Медицина, 364-365, 1971.
12. *Шапоп В.С.* Биохимические аспекты опухолевого роста. Медицина, М.: 314с., 1975.
13. *Шмаль Э.* Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
14. *Ghazaryan P.A., Ghazaryan V.V.* Membrane aspects of pathogenesis and therapy of cow's viral leukemia // International Congress of Microbiology. Brusel, - Abstr 11. 2003.
15. *Strittmatter W.J., Hirata F.* Biochem.biophys. Res. Commun, 88, 147-153, 1973.