



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

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЦИАНСОДЕРЖАЩИХ ЛАКТОНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ КОМПОНЕНТОВ ФОСФОИНОЗИТИДНОГО ЦИКЛА МЕМБРАН КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ САРКОМЕ - 45

¹ П.А. КАЗАРЯН, ² Н.С. КАРАГУЛЯН

Ереванский государственный университет
Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна
karagulyan2000@yandex.ru

Исследовалось содержание некоторых компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы мембран клеток селезенки при экспериментальной опухоли саркома-45. Установлено, что при этом происходит увеличение уровня моно-, ди- и трифосфоинозитидов, приводящее к нарушению коэффициентов их соотношений и деструктивным изменениям биомембран спленоцитов. После применения соединения циансодержащего лактона наблюдается определенная нормализация уровня изученных компонентов биомембран.

*Саркома-45- новое производное циансодержащих лактонов-
фосфоинозитиды, фосфоинозитидный цикл- селезенка*

Ուսումնասիրվել է փայծաղի բջիջների թաղանթների ֆոսֆոինոզիտիդային ազդանշանային համակարգի որոշ բաղադրամասերի պարունակության փոփոխությունները փորձարարական ուռուցքի սարկոմա-45-ի ժամանակ: Հաստատված է, որ այդ պայմաններում դիտվում է մոնո-, դի- և եմֆոսֆոինոզիտիդների մակարդակների բարձրացում և նրանց հարաբերակցության գործակիցների փոփոխություններ:

Ցիան խումբ պարունակող չիագեցած լակտոնի օգտագործումից հետո տեղի է ունենում ուսումնասիրվող բոլոր ցուցանիշների որոշակի նորմալացում:

*Սարկոմա-45 - ցիան խումբ պարունակող չիագեցած լակտոնների նոր ածանցյալ –
ֆոսֆոինոզիտիդներ - ֆոսֆոինոզիտիդային ցիկլ - փայծաղ*

The content of some components of phosphoinositide signaling system of splenocytes membranes in case of experimental tumour sarcoma-45 has been investigated. It has been established that under such conditions occurred a level growth of mono-, di- and triphosphoinositides leading to infringement of coefficients of their relations, as well as to destructive modifications of splenocytes biomembranes. After application of cyan containing lactone conjunction definite normalization of level of biomembranes' studied components is observed.

*Sarcoma-45-new derivative of cyanide lactone-phosphoinositides-phosphoinositide
cycle-spleen*

За последние десятилетия в изучении причин и особенностей злокачественных новообразований онкологическая наука достигла больших успехов. Вместе с тем распространенность и смертность продолжают увеличиваться, что делает проблему злокачественного роста одной из самых актуальных в биологии и медицине.

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].

По современным представлениям одним из морфофункциональных локусов, вовлекаемых в механизмы канцерогенеза различной этиологии, является клеточная мембрана, в молекулярной организации и функционировании которой важная роль отводится фосфоинозитидам [2, 3].

Исследование молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий и выявление ответственных звеньев в нарушениях регуляции ионтранспортных сигнальных систем и метаболизма основных липидных компонентов биомембран в настоящее время приобретают все большую актуальность. Наиболее важные достижения в области понимания механизмов образования и развития злокачественных новообразований были достигнуты путем исследования механизмов сигнальной трансдукции, активированных в ткани данной опухоли, и выявления нарушенных метаболических процессов.

Имеющиеся литературные данные [4, 5] о роли фосфоинозитидных (ФИ) посредников в передаче сигнала при онкологических заболеваниях требуют выяснения механизмов запуска и регуляции ФИ сигнальной системы, обеспечивающей антиапоптоз как нормальных, так и опухолевых клеток. Установлена непосредственная связь нарушений функционирования фосфоинозитол-3-киназного каскада, являющегося важнейшим звеном ФИ-сигнальной системы, с возникновением различных опухолей [4-6]. Так, повышение активности фосфоинозитид-3-киназы – фермента дефосфолирующего ФИ, наблюдается при опухолях молочной железы [7]. Развитие опухолей эндометрия, связанное со снижением уровня фосфатазы, также ингибирует фосфоинозитидный каскад. Установлено, что опухоли лимфатической системы – лимфомы, а также нейробластома, остеосаркома и саркома Юинга, опухоли печени связаны с вовлечением ФИ-сигнальной системы [5, 8-10]. Не исключается возможность подключения других сигнальных систем с активацией ферментов регуляции процессов пролиферации, транскрипции и промции опухолей [11, 12].

Очевидно, что понимание механизмов ФИ сигнальной системы в регуляции роста опухолей необходимо для разработки и поиска более эффективных схем лечения онкологических заболеваний.

В последние годы создан ряд нетоксичных ингибиторов ФИ-3-киназного сигнального пути, что позволяет разработать новые подходы для комбинированной противоопухолевой терапии [6, 13-15].

Учитывая вышеизложенное и исходя из неоспоримости роли биомембран в процессах трансформации нормальных клеток в опухолевые, нами были проведены исследования ранних этапов транслокации внешнего сигнала через плазматические мембраны клеток спленоцитов путем исследования некоторых компонентов ФИ сигнальной системы, в частности, монофосфоинозитидов (МФИ), дифосфоинозитидов (ДФИ) и трифосфоинозитидов (ТФИ).

Целью настоящей работы было исследование некоторых патогенетических механизмов развития опухолевого процесса при экспериментальной модели опухоли веретенчаточного происхождения – саркомы-45 (S-45) и противоопухолевой активности нового производного цианосодержащих лактонов.

Материал и методика.

Эксперименты проводились на 42 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200г, разделенных на три группы. Первая - контрольная группа состояла из 10 интактных животных. Животным второй и третьей групп подкожно переливали опухолевый штамм S-45, полученный из опухолевого банка Онкологического центра МЗ РФ (Москва). Переливку проводили в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии ГНТО НАН РА под руководством к.б.н. Р.Е. Мурадяна. Терапевтический эффект оценивали по степени ингибирования роста опухоли в процентах к контролю. Лечение было начато через 4 сут после переливки. Цианосодержащее производное лактона вводили в течение 3 дней непрерывно, однократно в виде водного раствора (из расчета 17,5 мг/кг массы животного). Животных забивали под эфирным наркозом на 15-е сутки эксперимента методом декапитации. Мембраны клеток тимуса получали методом дифференциального центрифугирования. Затем методом тонкослойной хроматографии проводили выделение и фракционирование ФИ на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мкм в системе хлороформ:метанол:аммиак (45:35:10) [17, 18]. Статистическую обработку данных проводили с учетом критерия достоверности по Фишеру - Стьюденту.

Результаты и обсуждение.

В результате проведенных экспериментов выявлены существенные количественные и качественные изменения в спектре ФИ (табл. 1).

Установлено, что формирование солидной опухоли саркомы-45 у экспериментальных животных приводит к значительному (почти двукратному, $p < 0.01$) повышению уровня ТФИ в мембранах клеток селезенки. При этом отмечалась явно выраженная тенденция к снижению уровня ДФИ и МФИ.

Полученные данные о количественных сдвигах компонентов фосфоинозитидного цикла свидетельствуют об активации ФИ сигнальной системы, что характерно для опухолевой трансформации, когда клетки теряют способность использовать защитные механизмы, что приводит к блокированию апоптоза [14].

Таблица 1. Количественные изменения абсолютного уровня ФИ клеток ткани селезенки при саркоме-45 и после применения нового цианосодержащего лактона
(мкг Р на 1г свежей ткани)

ФИ	Контроль (n=10)	Саркома-45 (n=20)	Лечение (n=22)	P_1	P_2	P_3
ТФИ	395.6±21.18	628.8±33.16	528.2±20.75	<0,01	<0,05	<0,05
ДФИ	595.1±15.46	572.9±25.16	471.3±18.28	>0,05	<0,05	>0,05
МФИ	473.8±17.14	435.8±47.12	301.75±12.64	>0,05	<0,01	<0,05

Примечание. P_1 – сравнение данных при саркоме-45 с контролем

P_2 – сравнение данных при саркоме-45 с данными после лечения

P_3 – сравнение данных после лечения с контролем

Анализ полученных данных выявил глубокие изменения метаболизма изученных компонентов фосфоинозитидного цикла в мембранах клеток селезенки

экспериментальных животных при саркоме-45. Накопление ТФИ способствует опухолевому росту, что согласуется с нашими морфологическими данными. Высокое содержание ТФИ и фосфатидных кислот (ФК) [2] возможно обусловлено подавлением активности фосфолипазы С - фосфоинозитидспецифичной фосфатазы и фосфатидатфосфатазы (соответственно).

Особый интерес представляют результаты проведенных нами исследований по изучению количественных и качественных изменений в спектре ФИ мембран клеток селезенки после применения нового производного (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид) циансодержащих лактонов. Установлено, что после применения этого соединения отмечается явно выраженная тенденция к нормализации уровня полифосфоинозитидов. Так, применение исследуемого лактона приводит к определенной нормализации содержания ТФИ в клеточных мембранах селезенки. В этих условиях абсолютный уровень ДФИ и МФИ незначительно снижается.

Более глубокий анализ полученных результатов, касающихся изучения особенностей изменения величин коэффициентов соотношений отдельных фракций ФИ, выявил неоднозначность характера их изменений. Так, при исследуемой патологии величины коэффициентов соотношений ТФИ/ДФИ и ТФИ/МФИ, а также ДФИ/МФИ возрастают (рис.1), что свидетельствует об ускорении процесса деградации компонентов фосфоинозитидного цикла. После введения циансодержащего производного лактона коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра ФИ при исследуемой патологии почти полностью нормализуются.

Таким образом, полученные нами данные являются доказательством нарушения регуляции фосфоинозитидного цикла при саркоме-45, следовательно и ФИ сигнальной системы, обеспечивающей транслокацию внешних сигналов, что позволяет контролировать такие кардинальные клеточные функции, как пролиферация и апоптоз.

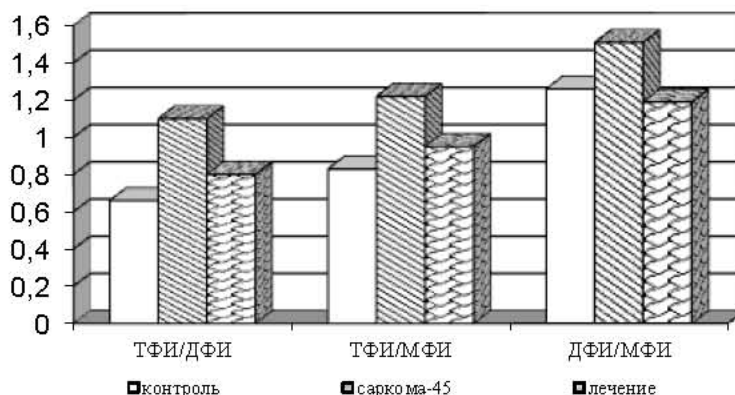


Рис. 1. Коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра фосфоинозитидов в ткани селезенки при саркоме-45 и после введения циансодержащего лактона

Нет сомнений, что вышеуказанные изменения в уровне важнейших компонентов этого каскада, в частности липидных вторичных посредников, может привести к нарушению деятельности функциональной активности биомембран, тем самым влияя на защитные механизмы, способствуя развитию злокачественных новообразований.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном воздействии изученного препарата на состояние компонентов фосфоинозитидного цикла, что приводит к стабилизации биомембран и восстановлению функциональной активности клеток тимуса.

Применение нового циансодержащего производного лактона указывает на его эффективность и, возможно, на противоопухолевую активность при саркоме-45, что дает предпосылки для дальнейших целенаправленных исследований.

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. *Вересов В.Г., Кабак А.Г., Вологовский И.Д.* Модель динамики внутриклеточного кальция, основанная на уточненной кинетике ингибирования инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительного кальциевого канала. Биофизика. 47(1), с.31-37, 2002.
3. *Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Овчинникова Л.К.* Роль ядерного транскрипционного фактора NF-каппа в этиологии, патогенезе и клиническом течении рака молочной железы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 5, с.10-13, 2009.
4. *Зинченко В.П., Долгачева Л.П.* Внутриклеточная сигнализация. Пушино, с.150, 2003.
5. *Зубер В.Л.* Выделение полифосфоинозитидов. Методы биохимических исследований. (Учебное пособие под ред. Прохоровой М.И.), с.72-80. Л., 1982.
6. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы. ЦОЛИУВ, с.28-40, М.1982.
7. *Карагулян А.С.* Роль нового производного циансодержащих лактонов в регуляции метаболизма компонентов фосфоинозитидного цикла мембран клеток тимуса при саркоме-45. Доклады НАН РА. 112 (3), с 297-302, Ереван 2012.
8. *Орловская И.А., Топорокова Л.Б., Феофанова Н.А.* PI3-киназы в иммунопатологии. Иммунология, 2, с.136-139, 2009.
9. *Слюсарь Н.Н.* Роль фосфоинозитидов и их метаболитов в онкогенезе: Дисс.докт.мед.наук.СПб. с.286-290, 1993.
10. *Чернов В.А., Богомолова Н.С., Минакова С.М., Сускова В.С.* Фармакокинетика проспирина и крыс. Фармакокинетика и метаболизм лекарственных препаратов. М, 1978.
11. *Шатская В.А., Красильников М.А., Павличенко О.В.* Значение фосфатидилинозитольного сигнального пути в развитии перекрестной устойчивости опухолевых клеток к гормональным цитостатикам и гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2, с.206-210, 2007.
12. *Шпаков А.О.* Роль фосфатидил-3-киназы в развитии онкологических заболеваний. Вопросы онкологии. 48, с.644-654, 2002.
13. *Ghazaryan P. A., Galoyan G.M., Karagulyan A.S.* The regulation of metabolism of cellular lipids using a cyan-containing derivative of lactone associated with sarcoma-45. International Society of Haematology Congress, European&African Divison, Budapest, Hungary, abstr. P030, 2007.
14. *Ghazaryan P.A., Panosyan T.R., Ghochikyan T.V., Harutunyan V.S., Ghazaryan A.P.* Exchange of membrane phospholipids metabolism and ion-transport enzymatic systems activity at sarcoma-180 and after using VAS-167. International Conference «Actual Issues of Haematology and Transfuziology». Yerevan-Stepanakert. J. Blood, 1(10), p.24, 2010.

15. Kingsbury S.R., Gout I.T. Phosphoinositide-3-kinases and cancer. *Experimental Oncology.*, 25, p.3-15, 2003.
16. Pendaries C., Tronchera N., Plantavid M., Payraastre B. phosphoinositide signaling disorders in human diseases *FEBS Lett.*, 546, p.25-31. 2003.
17. Toker A. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci.*, 59, p.761-779, 2002.
18. Toretsky J.A., Thaker M., Eskenazi A.E., Frantz C.N. Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewings sarcoma family of tumors. *Cancer Res.*, 59, p.5745-5750, 1999.