

БИОХИМИЯ

УДК 615.277.3, 543.852.6

П. А. Казарян^{1,2}, Т. Р. Паносян¹, А. С. Саакян¹, Т. В. Кочикян²

Состояние ион-транспортных ферментных систем при саркоме-180 и
после применения ВАС-167 – производного 4-бутанолидов

(Представлено академиком К. Г. Карагезяном 15/II 2011)

Ключевые слова: саркома-180, противоопухолевая терапия, производные 4-бутанолидов

Адекватный подбор высокочувствительных к химиотерапии злокачественных опухолей цитостатиков часто затруднен из-за высокой токсичности и избирательности действия этих препаратов. Вместе с тем установлено, что одним из структурно-функциональных локусов, вовлекаемых в механизмы канцерогенеза различной этиологии, является клеточная мембрана [1-4]. В связи с этим характер липид-белковых соотношений в биомембранах может отражать способность клетки реагировать на происходящие в организме при злокачественном росте и в динамике химиотерапии новообразований.

Цель настоящей работы состояла в выяснении некоторых патогенетических механизмов развития опухолевого процесса при саркоме-180 путем исследования активности ряда интегральных транспортных белков (Na/K- и Mg-АТФаз) в эритроцитах и лимфоцитах крови и клетках ткани селезенки.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 56 беспородных мышах массой 22-25 г. Формирование модели солидной опухоли проводилось путем перевивки опухолевого штамма саркома-180.

Саркома-180 (S-180) – экспериментальная опухоль веретенноклеточного происхождения, полученная в результате введения диметилбензантрацена в подкожную клетчатку животных в 1957 г. Е.Е. Погосянц (Институт тонкой органической химии АН АрмССР).

Штамм S-180 пассивировался на мышах в возрасте 3 месяцев. Экспериментальную опухоль саркомы брали на 14-й день ее развития. Перевивка

начиналась с дачи наркоза мышам-донору, затем подкожная опухоль вылущивалась для измельчения. Кусочки опухолевой ткани диаметром 1 мм (инокулум) с 0.5 - 1 мл раствора Хенкса (без фенолового красного) вводились мышам-реципиенту.

Производное 4-бутанолидов — ВАС-167 вводили внутривентрально через 48 ч после перевивки в течение 6 дней непрерывно, однократно в виде водного раствора (из расчета 0.2 мг/кг массы животного). Терапевтический эффект оценивали по степени ингибирования роста опухоли в процентах к контролю.

Экспериментальные животные были распределены следующим образом. Первая группа — интактная (20 мышей). Животные не подвергались никаким воздействиям, содержались в стандартных условиях. Вторая группа — саркома (18 мышей). Животным была привита опухоль S-180, срок развития которой на момент перевивки составил 14 суток. Животные не подвергались никаким воздействиям и содержались в стандартных условиях до наступления смерти. Третья группа — лечение (18 мышей). Животным была привита опухоль S-180, срок развития которой на момент перевивки составил 14 суток. Животным вводили препарат в течение 3 дней однократно.

Животных декапитировали под эфирным наркозом, производили забор крови. В исследованиях использовали мембраны эритроцитов и лимфоцитов крови и гомогенаты ткани селезенки, полученные общепринятыми методами дифференциального центрифугирования.

Активность фосфолипазы A_2 определяли по модифицированному методу П. А. Казаряна [5], активность АТФазы — по модифицированному методу Фиске и Субарроу [4], основанному на регистрации прироста неорганического фосфора в среде в ходе АТФазной реакции. Среда определения Na^+ , K^+ -АТФазы, помимо необходимых катионов, содержала 0.1 мМ уабаина. Реакцию начинали добавлением в пробы раствора АТФ нужной концентрации, прекращали с помощью 5 % раствора ТХУ.

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы изучали по разности между общей АТФазной активностью и активностью Mg^{2+} -зависимой АТФазы. Активность ферментов выражали в мкг неорганического фосфора на 1 мг белка. Оптическую плотность измеряли на СФ-46 при длине волны 700 нм.

Статистическую обработку данных проводили с учетом критерия достоверности по Фишеру — Стьюденту.

Результаты и обсуждение. В условиях эксперимента при оценке противоопухолевой активности по степени ингибирования роста опухоли (в % к контролю) установлено, что ВАС-167 при внутривентральном введении приводит к угнетению роста опухоли на 35-40%. Исходя из того, что важнейшим свойством мембран, в том числе и иммунокомпетентных клеток,

является обеспечение избирательной проницаемости ионов и различных веществ, а также из роли АТФазной системы в обеспечении активного транспорта через плазматические мембраны, представляло интерес изучение активности Na/K- и Mg-АТФаз, важнейших регуляторов клеточного метаболизма.

Согласно полученным данным, при саркоме-180 наблюдаются существенные изменения активности липидзависимых и мембраносвязанных АТФаз как в эритроцитах и лимфоцитах крови, так и в ткани селезенки (рис. 1-3). При этом в мембранах эритроцитов крови (рис.1) установлено статистически достоверное ($p < 0.01$) снижение Na/K-АТФазной активности с одновременным почти двукратным снижением активности Mg-АТФазы.

После введения препарата ВАС-167 в эритроцитах крови активность Na/K-АТФазы приближается к норме, деятельность Mg-АТФазы усиливается, однако не доходит до уровня контрольных величин.

Примечательно, что изменения деятельности АТФаз в мембранах лимфоцитов и клеток ткани селезенки более выражены ($p < 0.001$) по сравнению с таковыми в эритроцитах крови (рис.2, 3). При этом активность Na/K-АТФазы в лимфоцитарных мембранах подавляется почти в два раза, а в мембранах клеток ткани селезенки — на 70% по сравнению с контрольными данными.

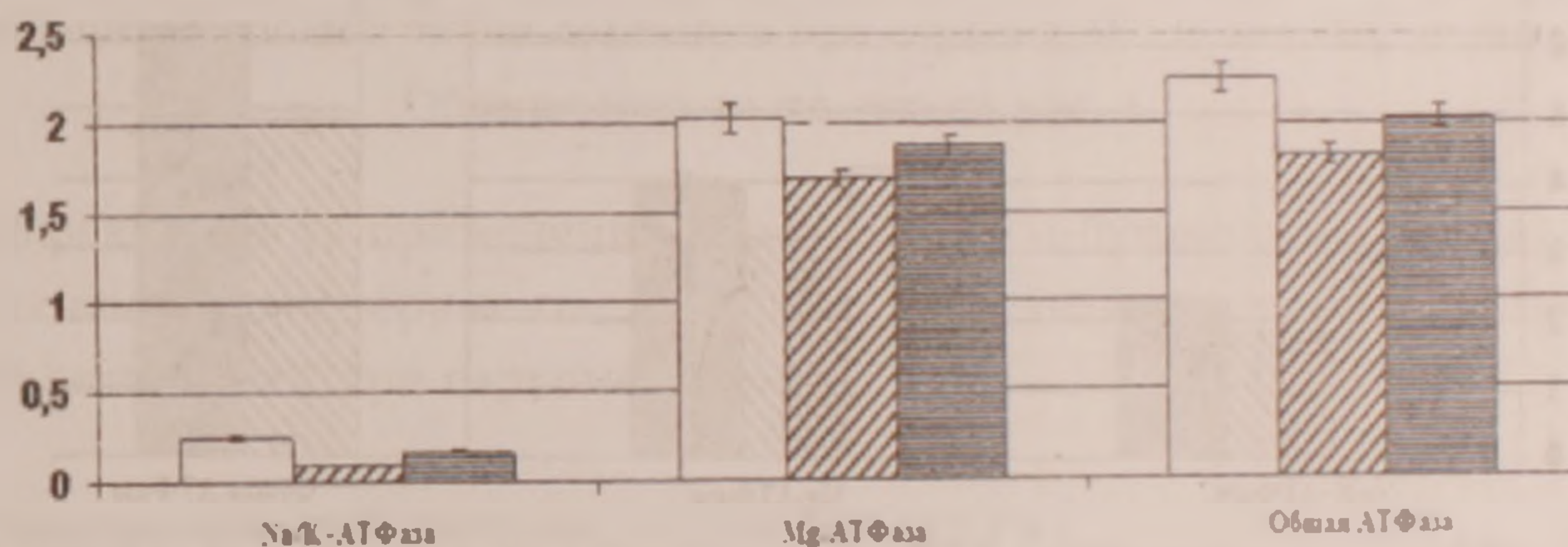


Рис. 1. Изменение активности АТФаз в мембранах эритроцитов крови при саркоме-180 (в $\mu\text{г Фн}/\text{мг белка}$). Белые столбики — контроль, косая штриховка — саркома, горизонтальная штриховка — лечение.

В условиях патологии деятельность Mg-АТФазы и общей АТФазной активности заметно ингибируется, что указывает на вовлечение лимфоцитов и селезенки в процессы злокачественной трансформации.

Внутрибрюшинное введение ВАС-167 приводит к активации мембранотранспортных энзимов до уровня контрольных величин, что безусловно свидетельствует о возможной интенсификации иммунной и компенсаторно-приспособительной реакций организма под действием этого биологически активного соединения.

По современным представлениям [4-7] изменение активности АТФаз главным образом связано с модификацией липидных компонентов биомембран, нарушением липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, изменением физико-химических свойств мембранных структур клеток. Физиологическая роль липидной фазы мембранных структур заключается в создании микроокружения, обеспечивающего конформационную стабильность мембраносвязанных белков-ферментов, в том числе и АТФаз.

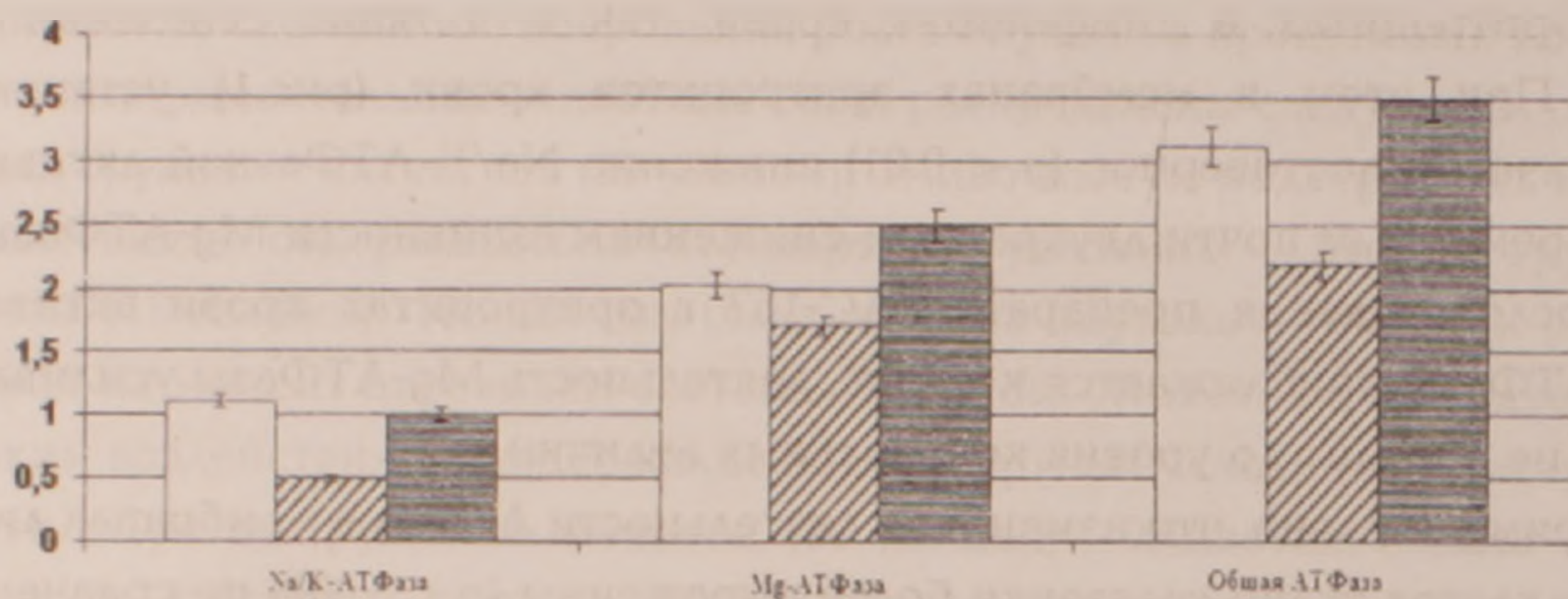


Рис. 2. Изменение активности АТФаз в мембранах лимфоцитов крови при саркоме-180 (в мкг Фн/мг белка). Обозначения те же, что на рис. 1.

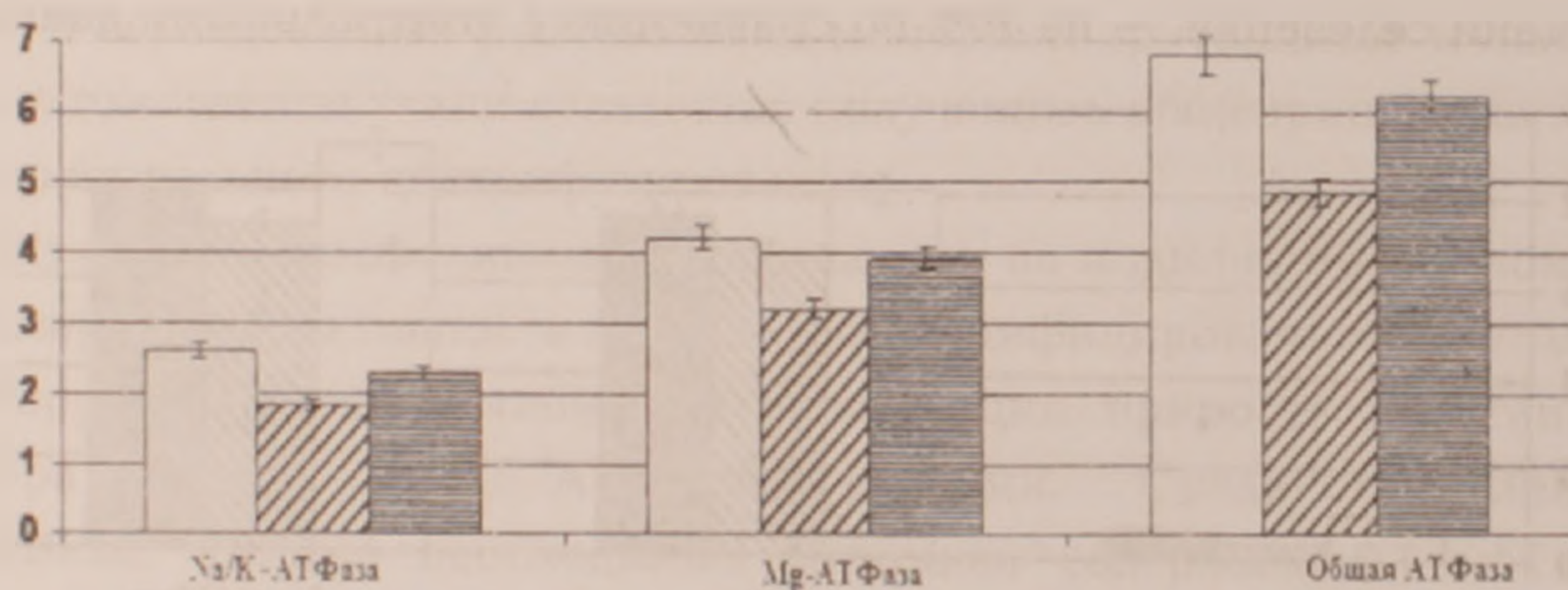


Рис. 3. Изменение активности АТФаз в мембранах клеток ткани селезенки при саркоме-180 (в мкг Фн/мг белка). Обозначения те же, что на рис. 1.

Были проведены также наблюдения за изменениями активности процессов деградации фосфатидов-глицеридов биомембран путем исследования деятельности фосфолипазы A_2 в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови при изучаемых состояниях организма.

Установлено, что экспериментальная саркома-180 характеризуется статистически достоверным ($p < 0.001$) повышением активности фосфолипазы A_2 как в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови, так и в мембранах клеток ткани селезенки подопытных животных (рис.4). Применение ВАС-167 приводит к существенному подавлению деятельности фермента и приближению его значения к уровню контрольных величин, что указывает на положительное воздействие препарата на процессы липолиза.

Таким образом, саркома-180 характеризуется нарушением деятельности мембраносвязанных ферментов и изменением качественного и количественного состава ФЛ биомембран [4]. Наблюдающиеся при этом изменения липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений сопровождаются существенными изменениями со стороны важнейших функций мембранных образований, включая транспортные и мессенджерные процессы, рецепцию эндогенных метаболически активных соединений, механизмы клеточных контактов. Это, в свою очередь, может явиться серьезной предпосылкой для нарушения функционального состояния при саркоме-180.

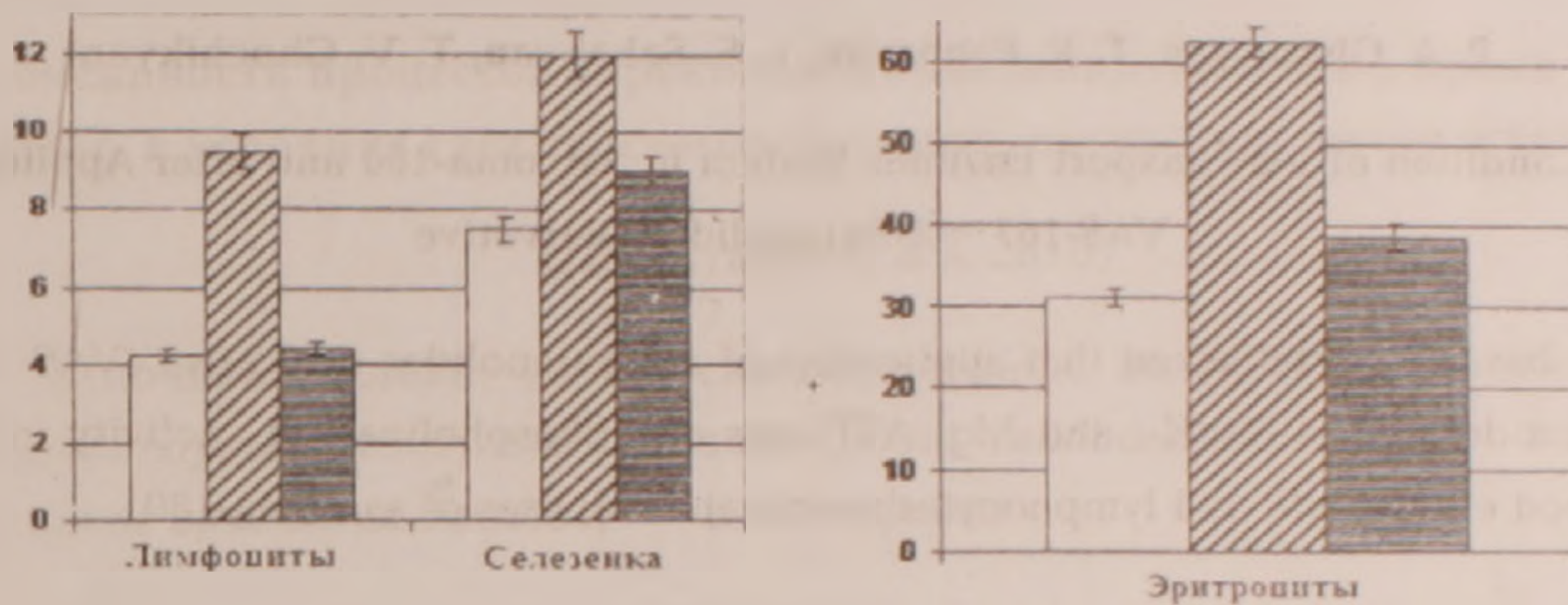


Рис. 4 Изменение активности фосфолипазы А₂ в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови и ткани селезенки при саркоме-180 (в мкг Фн/мг белка)

Обозначения те же, что на рис. 1.

Эффективность применения производного 4-бутанолидов – ВАС-167 в условиях нашего эксперимента, возможно, свидетельствует о его противоопухолевой активности при саркоме-180.

¹ Гематологический центр им. Р.О.Еоляна МЗ РА

² Ереванский государственный университет

П. А. Казарян, Т. Р. Паносян, А. С. Саакян, Т. В. Кочикян

Состояние ион-транспортных ферментных систем при саркоме-180 и после применения ВАС-167 – производного 4-бутанолидов

Установлено, что применение производного 4-бутанолида - ВАС-167 приводит к нормализации активности Na/K-, Mg-АТФаз и фосфолипазы А₂ как в мембранах эритроцитов и лимфоцитов, так и мембранах клеток печени.

Պ. Ա. Ղազարյան, Տ. Ռ. Փանոսյան, Լ. Ս. Սահակյան, Տ. Վ. Դոչիկյան

Իոնտրոնսպորի ֆերմենտային համակարգի վիճակը սարկոմա-180-ի ժամանակ եւ
4-բութանոլիդների ածանցյալ՝ ՎԱՍ-167-ի օգտագործումից հետո

Բազահայտված է, որ 4-բութանոլիդների ածանցյալ՝ ՎԱՍ-167-ի օգտագործումը կանոնավորում է արյան էրիթրոցիտների եւ լիմֆոցիտների թաղանթներում, ինչպես նաեւ փայծաղի բջջային թաղանթներում, Na/K-, Mg- АТФ-ազների եւ ֆոսֆոլիպազա Ա₂-ի ակտիվությունը:

P. A. Ghazaryan, T. R. Panosyan, L. S. Sahakyan, T. V. Ghochikyan

The Condition of Iontransport Enzymes System in Sarcoma-180 and after Application
VAS-167 – 4-Butanolides Derivative

It has been established that application of a 4-butanolides derivative (VAS-167) results in a definite of Na/K-, and Mg- ATP-ases and phospholipase A₂ activity in spleen and blood erythrocyte and lymphocytes membranes mouses of sarcoma-180.

Литература

1. Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г. - Хим журн. Армении. 1992. N 3-4. Т. 46 С. 219-236.
2. Владимиров Ю.А. - Соревский образовательный журнал. 2000. N6(12) С. 13-19
3. Гончарова Т.А. Влияние озонированного физиологического раствора на функциональное состояние печени крыс в норме и с саркомой-45. Автореф. канд. дис. Нижний Новгород. 1997
4. Ghazaryan P.A., Panosyan T.R., Ghochikyan T.V. et.al. - Blood. 2010. N1(10) P. 25.
5. Казарян П.А., Антонян Ф.Х. Способ определения активности воспалительного процесса при периодической болезни. Авторское свидетельство СССР N4705102/30-14/081292. 1992
6. Нагурадзе Н.И., Грекулова А.Н., Ковтарадзе В.Г. - Бюл. эксперим. биол. и мед. 1993. Т. 125. N 2. С. 135
7. Захарова Н.Б., Рубин В.И. - Лабораторное дело. 1980. 12. С. 735-738