

БИОХИМИЯ

УДК 615.277.3, 543.852.6

Ս. Ա. Կազարյան, Լ. Տ. Տաակյան, Ա. Տ. Կարաղուլյան, ակադեմիկ Ա. Ա. Ավեգիսյան

Противоопухолевые свойства производного цианосодержащих лактонов

(Представлено 9/VI 2007)

Ключевые слова: саркома-45, цианосодержащие лактоны, фосфолипиды, Na/K-АТФаза

Как известно, в патогенезе злокачественных новообразований, а также их осложнений важную роль играют нарушения антиоксидантного статуса организма, ведущие к токсическому повреждению клеточных мембран и углублению синдрома эндогенной интоксикации. Показано, что при саркоме опухоль в организме-хозяине вызывает окислительный стресс - свободнорадикальный процесс, сопровождающийся подавлением активности большинства компонентов антиоксидантной системы защиты организма и накоплением продуктов ПОЛ в крови [1-3].

С позиций современной мембранологии патогенез многих заболеваний связан с изменением структуры и функции биологических мембран, в формировании которых важная роль принадлежит липидам, в частности фосфолипидам (ФЛ). Изменение скорости ПОЛ является одним из проявлений структурно-функциональных нарушений биомембран [4, 5]. Продукты ПОЛ влияют на биологическую активность клеток, проницаемость и ригидность мембран, стимулируют фагоцитоз, инактивируют мембранно-связанные и липидзависимые ферментные системы [1, 6, 7].

В литературе много данных о состоянии процессов ПОЛ и антиоксидантной системы при различных опухолях, в частности перевиваемой саркоме-45, однако комплексная оценка повреждений биомембран с учетом деятельности мембранозависимых ферментных систем не встречается.

Цель настоящей работы состояла в выяснении некоторых патогенетических механизмов развития опухолевого процесса при саркоме-45 путем

исследования липидных компонентов мембран и активности некоторых интегральных транспортных белков (Na/K- и Mg-АТФаз) лимфоцитов крови, ткани тимуса и селезенки.

Материал и методы. Эксперименты были выполнены на 60 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г. Формирование модели солидной опухоли проводилось путем перевивки опухолевого штамма саркома-45. Саркома-45 (S-45) является экспериментальной опухолью веретенчатого происхождения, полученной в результате введения диметилбензантацена в подкожную клетчатку беспородной крысы по методу Е.Е. Погосянца (1957).

Штамм S-45 пассировался на крысах в возрасте 3 месяцев. Саркому брали на 14 день развития. Перевивка начиналась с дачи наркоза крысе-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 крысе-реципиенту. Терапевтический эффект оценивали по степени ингибирования роста опухоли в процентах к контролю.

Для проведения исследования экспериментальные животные были распределены следующим образом: первая группа - интактная (20 крыс). Животные не подвергались никаким воздействиям, содержались в стандартных условиях; вторая группа - саркома (18 крыс). Животным была привита опухоль S-45, 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 крыс). Животным была привита опухоль S-45, срок развития которой на момент перевивки составил 14 суток. Животным вводили препарат в течение 3 дней однократно в дозе 17.5 мг/кг массы животного (максимально переносимая доза - 35 мг/кг).

Животных декапитировали под эфирным наркозом, производили забор крови. В исследованиях использовали гомогенаты ткани селезенки, тимуса, полученные дифференциальным центрифугированием при 15000g, и лимфоциты крови, выделенные в градиенте плотности фиколла-верографина.

Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли методом тонкослойной хроматографии [8] в модификации П.А. Казаряна [9] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (ЧССР). Для разделения ФЛ использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Липидный фосфор определяли по Светашеву [10]. Содержание ФЛ выражали в мкг липидного фосфора на 1 г ткани и определяли коэффициенты их соотношений.

Определение активности АТФаз проводили по модифицированному методу Фиске и Субарроу [1], основанному на регистрации прироста

неорганического фосфора в среде в ходе АТФазной реакции. Среда определения Na^+ , K^+ -АТФазы, помимо необходимых катионов, содержала 0.1 мМ убаина. 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 мг белка. Оптическую плотность измеряли на СФ-46 при длине волны 700 нм. Статистическую обработку данных производили с учетом критерия достоверности по Фишеру-Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований (табл. 1-3) свидетельствуют, что саркома-45 характеризуется существенным нарушением спектра мембранных ФЛ, приводящим к значительным изменениям ФЛ/ФЛ соотношений. Так, в изученных тканях и лимфоцитах крови в условиях патологии резко ($p < 0.001$) повышаются величины соотношения ЛФХ/ФХ, что свидетельствует о преобладании процессов распада над процессами синтеза мембранных ФЛ. Многократные повышения соотношения регистрируются в ткани селезенки, тимусе и лимфоцитарных мембранах.

Таблица 1

Изменение коэффициентов ФЛ/ФЛ соотношений в мембранах лимфоцитов при саркоме-45

Соотношение	Контроль, $n = 22$	Саркома, $n = 20$	Лечение, $n = 20$
ЛФХ/ФХ	0.43	1.3	0.84
ФХ/ФК	3.5	2.9	3.2

Интересно, что повышение величины указанного показателя наиболее выражено (почти шестикратно) в ткани селезенки (табл. 3), что свидетельствует об интенсивных деструктивных процессах и массивном выбросе цитотоксичных соединений в кровь.

Таблица 2

Изменение коэффициентов ФЛ/ФЛ соотношений в ткани тимуса при саркоме-45

Соотношение	Контроль, $n = 22$	Саркома, $n = 20$	Лечение, $n = 20$
ЛФХ/ФХ	0.22	0.63	0.20
ФХ/ФК	6.38	1.38	5.8

Такое предположение подкрепляется литературными данными [7, 11, 12], указывающими на развитие эндогенной интоксикации на фоне подавления иммунной реакции организма. Так, у животных с имплантированными опухолями, и в частности при саркомах, наблюдается значительное повышение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови, что приводит к секреции неоплазмы и атакующих ее фагоцитов в окружающую среду.

Часть образующихся в них активных форм кислорода (АФК) создает прооксидантное состояние, цитотоксичное для циркулирующих в них форменных элементов крови.

Таблица 3

Изменение коэффициентов ФЛ/ФЛ соотношений в ткани селезенки при саркоме-45

Соотношение	Контроль, $n = 22$	Саркома, $n = 20$	Лечение, $n = 20$
ЛФХ/ФХ	0.081	0.48	0.09
ФХ/ФК	22.7	1.14	12.6

По отношению к иммунокомпетентным клеткам такая реакция растущего новообразования предстает как противодействие эффекторам в форме известной иммунодепрессии в опухолевом организме. В этих условиях организм в порядке самозащиты мобилизует в систему кровообращения некоторые, отличающиеся от внутриклеточных, антиоксиданты [2, 5, 13].

В условиях нашего эксперимента в мембранных структурах исследуемых тканей резко ($p < 0.001$) снижается коэффициент соотношения ФХ/ФК: в лимфоцитарных мембранах в 1.2 раза, ткани тимуса и селезенки в 4.6 и 20 раз соответственно. Такие глубокие отклонения ФЛ/ФЛ соотношений свидетельствуют о существенном подавлении процессов синтеза мембранных глицеролипидов, с одной стороны, и усилении процессов ПОЛ, с другой.

Особый интерес представляют результаты последующих исследований, касающиеся возможностей коррекции выявленных метаболических нарушений при изученных состояниях организма. Ранее проведенными нами исследованиями выявлены определенные мембраностабилизирующие свойства производных циансодержащих лактонов [14].

Исследуемое нами соединение 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутэн-4-олид является производным ненасыщенных лактонов. В медицине лактоны применяются главным образом в качестве противовоспалительных препаратов. Природные лактоны отличаются определенными противоопухолевыми свойствами. Некоторые из производных лактонов ингибируют рост опухоли при лимфомах [3].

В условиях нашего эксперимента при оценке терапевтической эффективности по степени ингибирования роста опухоли (в % к контролю) установлено, что изучаемое производное лактона вызывает угнетение роста саркомы-45 у экспериментальных животных на 32-43%. Применение циансодержащего лактона приводит к определенной нормализации изученных показателей. Так, под действием препарата наблюдается явно выраженная тенденция к повышению коэффициента ФХ/ФК во всех исследуемых мембранных структурах. Примечательно, что в лимфоцитарных мембранах величина изученного показателя восстанавливается до уровня контрольных величин. В этих условиях одно из важнейших ФЛ/ФЛ соотношений, в частности ЛФХ/ФХ, указывающее на выброс цитотоксичных лизоФЛ в кровь, во всех изученных тканях почти полностью нормализуется.

Таким образом, саркома-45 характеризуется существенными изменениями коэффициентов липид-липидных соотношений как в мембранах лимфоцитов крови, так и в ткани тимуса и селезенки подопытных животных. Введение же циансодержащих лактонов (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутэн-4-олид) приводит к определенной нормализации изученных липид-липидных соотношений.

Как известно, важнейшим свойством мембран, в том числе и иммунокомпетентных клеток, является обеспечение избирательной проницаемости ионов, аминокислот и сахаров. При этом ответственной за активный транспорт через плазматические мембраны является Na/K-АТФаза, встроенная в мембранный аппарат клетки и создающая разницу концентраций одновалентных катионов Na^+ и K^+ , используемых для протекания ключевых реакций жизнедеятельности - генерации возбуждения, водно-солевого обмена и регуляции клеточного метаболизма [12, 15].

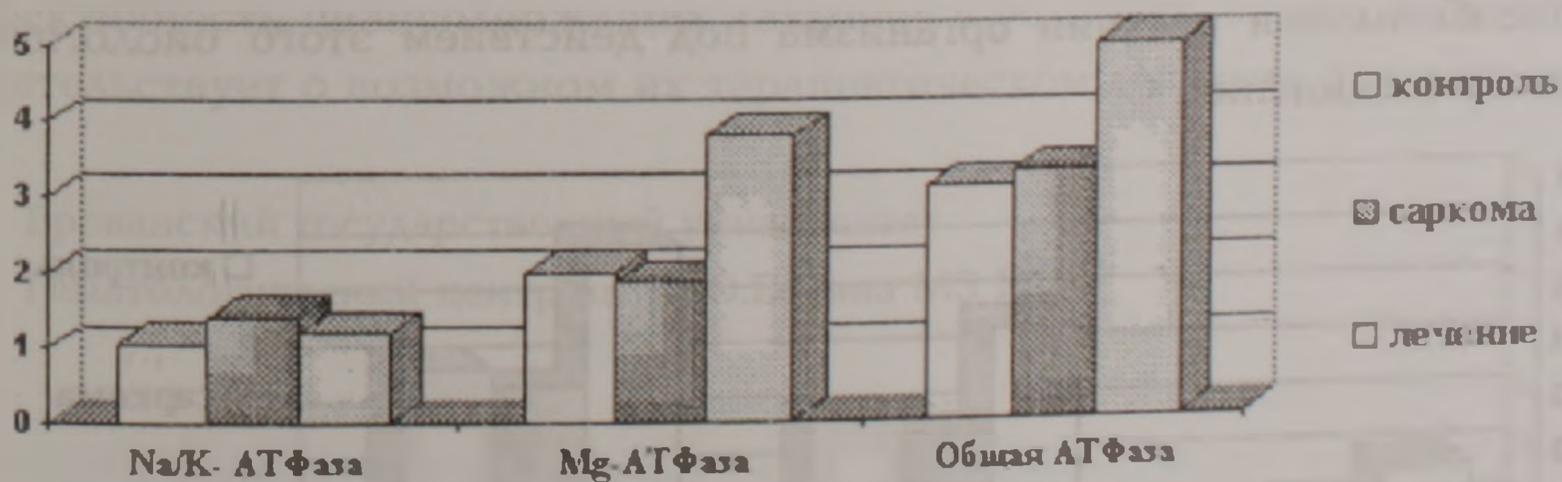


Рис. 1. Изменение активности АТФаз в лимфоцитах крови при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

Согласно полученным данным при саркоме-45 наблюдается изменение активности липидзависимых и мембраносвязанных АТФаз как в лимфоцитах крови, так и в изученных тканях (рис. 1-3). При этом в мембранах лимфоцитов

крови (рис. 1) установлено заметное (на 20%) повышение Na/K-АТФазной активности, с одновременным почти двукратным снижением активности Mg-АТФазы. После введения препарата в лимфоцитах крови активность Na/K-АТФазы приближается к норме, тогда как деятельность Mg-АТФазы резко усиливается. Указанные изменения в лимфоцитарных мембранах происходят при повышенной общей АТФазной активности.

Последующие исследования касались изучения ионтранспортной системы в мембранных структурах тканевых клеток подопытных животных. Установлены значительные отклонения активности изученных ферментных систем в ткани тимуса при саркоме-45. Активность Na/K-АТФазы возрастает на 12% ($p < 0.005$), а уровень Mg-АТФазы - на 74.2% на фоне двукратного повышения общей АТФазной активности (рис. 2).

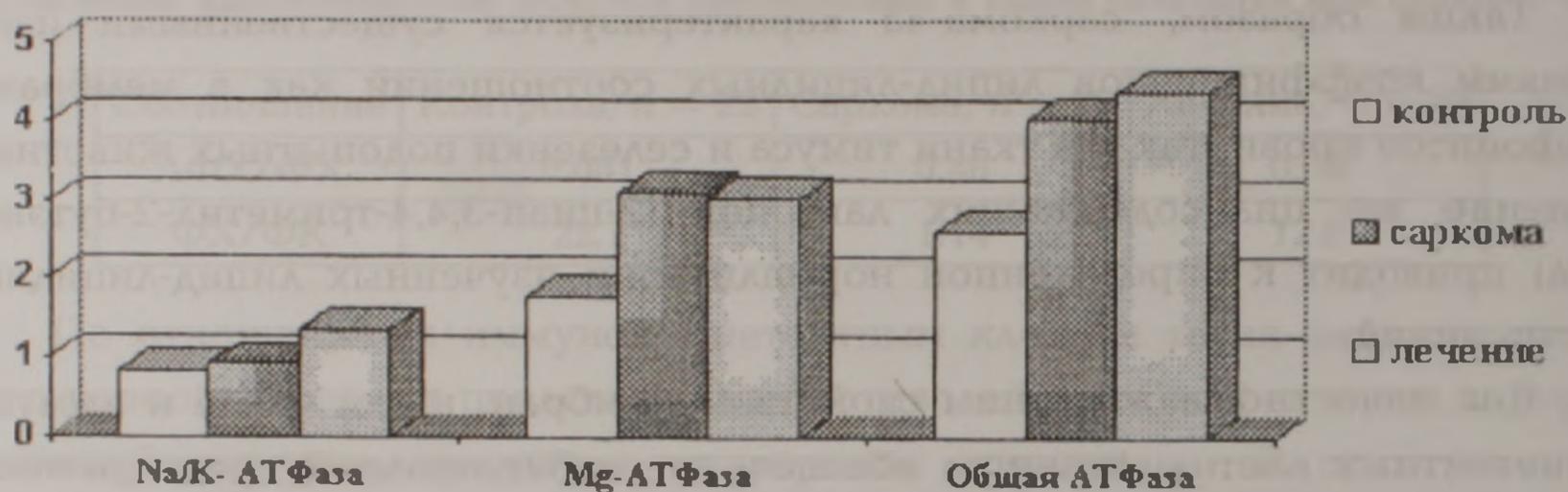


Рис. 2. Изменение активности АТФаз в тимоцитах крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

Внутрибрюшинное введение цианосодержащего производного лактона приводит к активации мембранотранспортных энзимов в ткани тимуса, что свидетельствует о возможной интенсификации иммунной и компенсаторно-приспособительной реакции организма под действием этого биологически активного соединения.

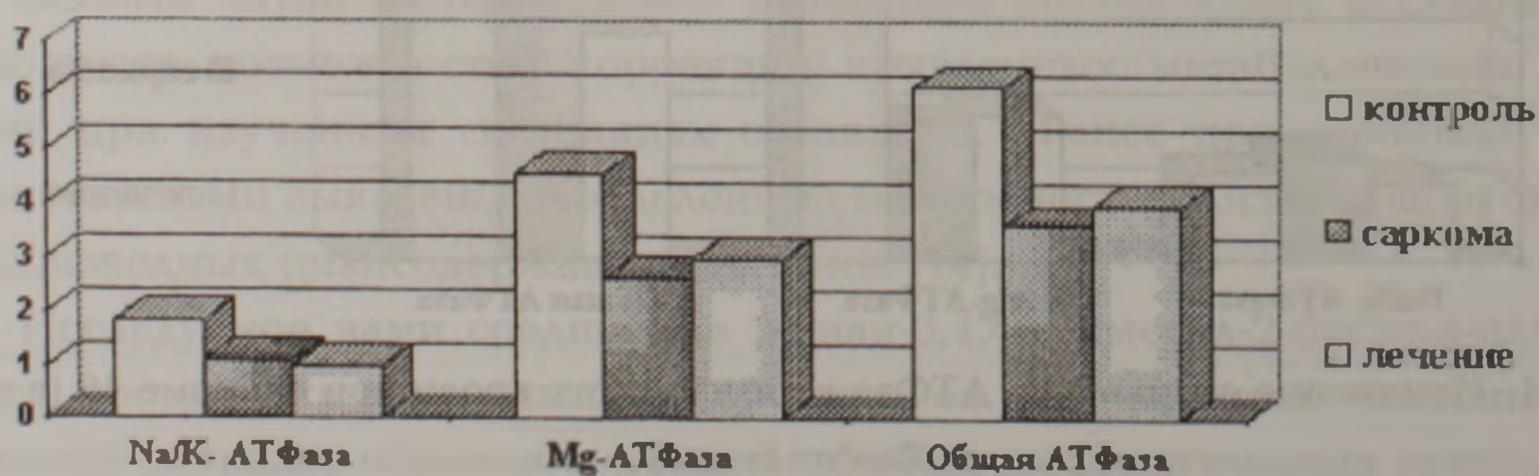


Рис. 3. Изменение активности АТФаз в ткани селезенки крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

Особый интерес представляют результаты исследования активности транспортных АТФаз в ткани селезенки подопытных животных. В условиях патологии активность всех изученных АТФаз заметно ингибируется, что указывает на вовлечение селезенки в процессы злокачественной трансформации. После применения изучаемого соединения отмечается лишь тенденция к нормализации этих показателей, что согласуется и с данными ФЛ/ФЛ соотношений в ткани селезенки.

По современным представлениям [12] 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.

Примечательно, что в ткани селезенки процессы деструкции и подавления синтеза ФЛ наиболее выражены в условиях патологии и введение препарата приводит к тенденции их нормализации.

Таким образом, можно заключить, что саркома-45 характеризуется нарушением деятельности мембранно-связанных ферментов и, возможно, изменением качественного и количественного состава ФЛ биомембран. Наблюдающиеся при этом изменения липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений сопровождаются существенными изменениями 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-45. Эффективность циансодержащих лактонов в условиях нашего эксперимента свидетельствует о возможном их терапевтическом действии при саркоме-45.

Ереванский государственный университет

Гематологический центр им. Р.О.Еоляна МЗ РА

П. А. Казарян, Л. С. Саакян, А. С. Карагулян, академик А. А. Аветисян

Противоопухолевые свойства производного циансодержащих лактонов

Установлено, что применение производного циансодержащих лактонов приводит к определенной нормализации фосфолипид-фосфолипидных соотношений,

Na/K-, Mg-ATФаз в ткани селезенки, тимуса и мембран эритроцитов крови при саркоме-45.

Պ.Ա.Ղազարյան, Լ.Ս.Սահակյան, Ա.Ս.Ղարագուլյան, ակադեմիկոս Ա.Ա.Ավետիսյան
Ցիան պարունակող լակտոնների ածանցյալի հակաուռուցքային հարկությունները

Հաստատված է, որ ցիան պարունակող լակտոնների ածանցյալի օգտագործումը սարկոմա-45-ի ժամանակ փայծաղի, թիմուսի հյուսվածքներում ու արյան էրիթրոցիտների թալանթներում հանգեցնում է ֆոսֆոլիպիդ-ֆոսֆոլիպիդային հարաբերությունների, Na/K-, Mg-ԱԵՖ-ազի ակտիվության որոշակի նորմավորմանը:

P. A. Ghazaryan, L. S. Sahakyan, A. S. Garagulian, academician A. A. Avetissyan

Antitumoral Properties of Cyan Containing Lactones Derivative

It has been established that application of a derivative of cyan containing lactones brings to a definite normalization of phospholipid-phospholipid ratios, Na/k-, and Mg-ATP-ases in spleen, thymus tissues and blood erythrocyte membranes at sarcoma-45.

Литература

1. *Захарова Н.Б., Рубин В.И.* - Лабораторное дело. 1980. N 12. С. 735-738.
2. *Щербатюк Т.Г.* Влияние озонированного физиологического раствора на прооксидантную и антиоксидантную системы у крыс с саркомой-45. Автореф. канд. дис. Нижний Новгород, 1997. 27 с.
3. *Nersesyan A.K., Melikyan G.S., Muradyan R.E., Stopper H.S.* - Exp. Oncol. 2003. V. 25. N 4. P. 266-269.
4. *Слюсарь Н.Н.* Роль фосфоинозитидов и их метаболитов в онкогенезе. Автореф. докт. дис. СПб. 1993. 30 с.
5. *Rosenberg S.A.* - Nature. 2001. V. 3. P. 999-1005.
6. *Владимиров Ю.А.* - Соровский образовательный журнал. 2000. Т. 6. N 12. С. 13-19.
7. *Димант И.Н., Шарилов Р.К., Муратходжаев Н.К.* Окислительные процессы и опухолевый рост. Ташкент. 1992. 156 с.
8. *Хроматография в тонких слоях (под ред. Шталя Э.)* 1965. 508 с.
9. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Нарушение фосфолипидного обмена. М. 1985. 28 с.
10. *Светашев В.И.* Микротехника анализа липидов и ее использование.

Автореф. канд. дис. Владивосток. 1973. 25 с.

11. *Гончарова Т.А.* Влияние озонированного физиологического раствора на функциональное состояние печени крыс в норме и с саркомой-45. Автореф. канд. дис. Нижний Новгород. 1997.

12. *Надирадзе Н.И., Грекулова А.Н., Ковтардзе В.Г.* - Бюл. эксперим. биол. и мед. 1993. Т. 125. N 2. С. 135.

13. *Sun Y.* - Free Radical Biol. and Med. 1990. V. 8. P. 583-599.

14. *Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г.* - Хим. журнал Армении. 1992. N 3-4. Т. 46. С. 219-236.

15. *Болдырев А.А.* Na/K-АТФаза - свойства и биологическая роль. Биология. 1998. С. 31-38.