

ԱԵՒ ԾԵՒ ԸՅ

УДК 615.277.3, 543.852.6

Ի . Ա. Էնճաճյի, Ե. Ն. Նաաեյի, Ա. Ս. Էաձաձոյի, աեաաի եե Ա. Ա. Աաձոյի

Ի ծիձեաիիծիեաաւա նաիեթձաա իծիեճաիաիաի օեաի նիաաձաեաւեօ եաեծիիա

(Представлено 9/VI 2007)

Էթ-աաւա նիաա: *саркома-45, циансодержащие лактоны, фосфолипиды, Na/K-ATФаза*

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.

Исследования 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 диметилбензантрацена 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 фикола-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

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.

Общая таблица 3

Таблица 3. Соотношение ЛФХ/ФХ и ФХ/ФК в сыворотке крови у животных с саркомой и в контроле

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 цианосодержащего 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 цианосодержащих 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].

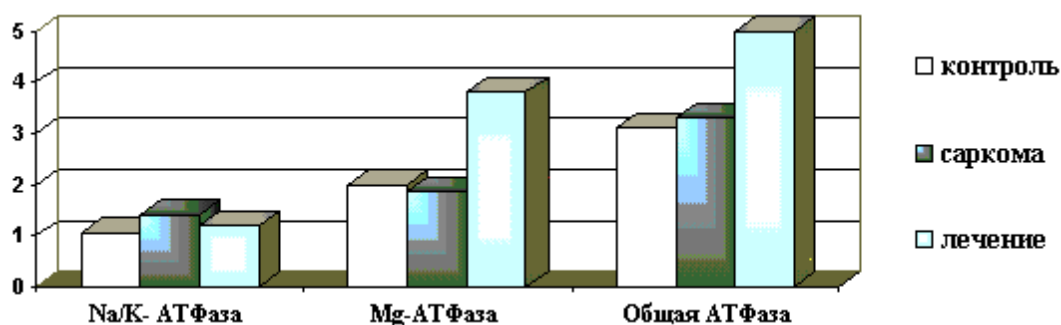


Рис. 1. Изменение активности АТФаз в лимфоцитах крови при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

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).

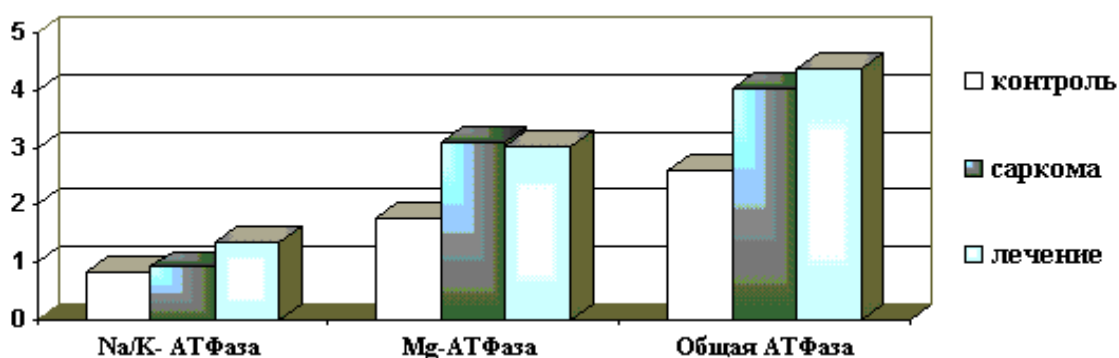


Рис. 2. Изменение активности АТФаз в тимоцитах крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

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.

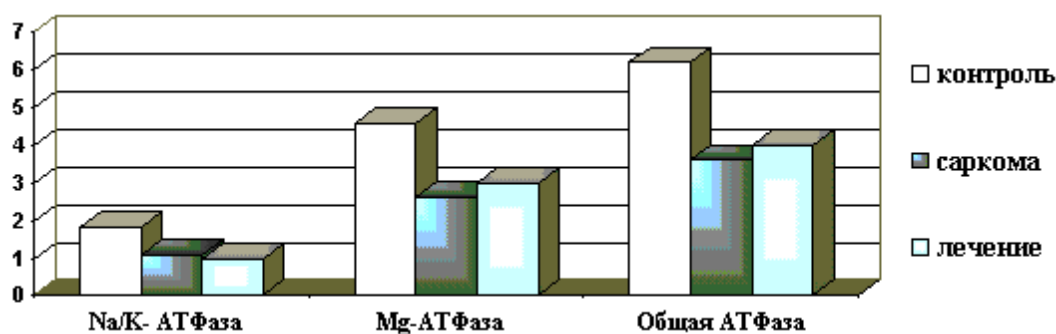


Рис. 3. Изменение активности АТФаз в ткани селезенки крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка)

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 мембранно-связанных 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

Ի . Ա. Էսթաճյւի, Է. Ն. Նաաբյւի, Ա. Տ. Էսթաճօբյւի, աեաաաի եե Ա. Ա. Աաաօեմյւի

Ի ժիժեաի ի թիթեաաի նաի եմօաա ի ժիթթաի աի իաի թեաի նի աաժաեաւեօ եաեօի ի ա

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

Ֆիա նպարունակող լակտոնների ածանցյալի հակաուռուցքային հատկությունները

Նաստարված է, որ ցիան պարունակող լակտոնների ածանցյալի օգտագործումը սարկոմա-45-ի ժամանակ փայծաղի, թիմուսի հյուսվածքներում ու արյան էրիթրոցիտների թաղանթներում 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.

Եօօձձօօձ

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., Шарипов 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., Ковтарадзе В.Г.* - Бюлл. 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.