

БИОХИМИЯ

УДК 615.277.3, 543.852.6

Ս. Ա. Կազարյան^{1,2}, Թ. Ր. Փանոսյան¹, Կ. Ի. Իսրայելյան¹, Թ. Վ. Կոչիկյան²

Роль ВАС-167 – производного 4-бутанолидов в регуляции метаболизма
фосфоинозитидов гепатоцитов при саркоме-180

(Представлено академиком К.Г.Карагезяном 16/III 2011)

Ключевые слова: саркома-180, производное 4-бутанолидов, фосфоинозитиды, фосфоинозитидный цикл, гепатоциты

Исследование механизмов межклеточных взаимодействий, поиск ответственных звеньев в нарушениях регуляции сигнал-трансдукторных систем, приводящих к изменениям внутриклеточных процессов, приобретает все большую актуальность.

В последние годы активно обсуждается роль фосфоинозитидных мессенджеров в передаче сигнала при онкологических заболеваниях. Изучение тонких механизмов запуска и регуляции фосфоинозитидной сигнальной системы, обеспечивающей антиапоптоз как нормальной, так и опухолевой клетки, имеет важное значение для понимания молекулярных основ опухолевого роста [1, 2]. Установлена отчетливая связь нарушений функционирования фосфоинозитол-3-киназного каскада, являющегося важнейшим звеном фосфоинозитидной сигнальной системы, с возникновением широкого спектра опухолей, различающихся по своей природе и локализации в организме [1, 3]. Так, повышение активности фосфоинозитид-3-киназы, фермента, дефосфорилирующего фосфоинозитиды, наблюдается при опухолях молочной железы [4]. Развитие опухолей эндометрия, связанное со снижением уровня фосфатазы, также ингибирует фосфоинозитидный каскад [2, 5]. Показано, что опухоли яичников, предстательной, поджелудочной и щитовидной желез также сопряжены с экспрессией регуляции фосфоинозитидной сигнальной системы [6, 7].

Опухоли лимфатической системы — лимфомы, развитие множественной миеломы, нейробластома, меланома, остеосаркома и саркома Юинга, опухоли печени, прямой кишки так или иначе связаны с вовлечением фосфоинозитидной сигнальной системы, механизмы активации которой имеют широкий спектр; возможны также параллельные подключения других сигнальных систем с активацией ферментов регуляции пролиферации, транскрипции и промоции опухолей [2, 8, 9].

Понимание механизмов фосфоинозитидной сигнальной системы в регуляции роста опухолей необходимо для разработки и поиска более эффективных схем лечения онкологических заболеваний. Рецепторные и нерецепторные элементы фосфоинозитидного сигнального механизма стали в настоящее время мишенями для воздействия новых лекарств.

В последние годы создан ряд нетоксичных ингибиторов фосфоинозитид-3-киназного сигнального пути, что позволяет разработать новые подходы для комбинированной противоопухолевой терапии [3, 10, 11]. Так, результаты экспериментальных исследований противоопухолевого препарата проспидина при саркоме свидетельствуют об эффективности его биотрансформации в ткани различных органов [12].

С учетом вышеизложенного и исходя из неоспоримости роли биомембран в процессах перерождения нормальных клеток в опухолевые нами были исследованы ранние этапы транслокации внешнего сигнала через плазматические мембраны гепатоцитов путем исследования некоторых компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы, в частности, моно- (МФИ), ди- (ДФИ) и трифосфоинозитидов (ТФИ). Рассматривая некоторые патогенетические механизмы развития опухолевого процесса при саркоме-180 (S-180), мы выявили мембраностабилизирующее свойство соединения ВАС-167(1,3,4-тиодиазоламид 4-изопропоксиметил-2-карбоксиметилбутенолида), выступающего в качестве активатора ряда ион-транспортных систем [13].

Целью настоящей работы являлось исследование противоопухолевой активности соединения ВАС-167 после формирования экспериментальной модели веретеночного происхождения — опухоли саркомы-180.

Материал и методы исследований. Эксперименты проводились на 30 беспородных мышах массой 22-25 г, разделенных на три группы, по 10 животных в каждой. Первая, контрольная, группа состояла из 10 интактных животных. Животным второй и третьей групп подкожно перевивали опухолевый штамм S-180, полученный из опухолевого банка Онкологического центра МЗ РФ (Москва). Перевивку проводили в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии ГНТО НАН РА под

руководством Р.Е.Мурадяна. Терапевтический эффект оценивали по степени ингибирования роста опухоли в процентах к контролю. Лечение было начато через 48 ч после перевивки. Одновременно определяли качественный и количественный состав мембранных фосфоинозитидов гепатоцитов подопытных животных. ВАС-167 вводили в течение 6 дней непрерывно, однократно в виде водного раствора (из расчета 0.2 мг/кг массы животного). Животных забивали под эфирным наркозом на 15 сутки эксперимента методом декапитации. После перфузии печени и гомогенизации методом дифференциального центрифугирования получали мембраны гепатоцитов, затем выделяли фосфоинозитиды [14]. Методом тонкослойной хроматографии осуществляли фракционирование фосфоинозитидов на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мкм в системе хлороформ:метанол:аммиак (45:35:10) [15]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия достоверности Фишера – Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных экспериментов наблюдаются количественные изменения в спектре фосфоинозитидов (табл.1).

Таблица 1

Количественные изменения фосфоинозитидов гепатоцитов при саркоме-180 и после введения ВАС-167 (в мкг Р на 1 г свежей ткани)

| Фосфоинозитиды | Контроль ($n = 10$) | Саркома-180 ($n = 10$) | Лечение ($n = 10$) | P_1 | P_2 | P_3 |
|----------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------|---------|--------|
| ТФИ | 69.73±17.11 | 111.22±19.33 | 86.31±15.35 | < 0.01 | < 0.05 | > 0.5 |
| ДФИ | 61.70±14.44 | 121.96±20.84 | 88.39±10.46 | < 0.001 | < 0.001 | > 0.05 |
| МФИ | 86.51±17.42 | 99.59±19.88 | 64.73±13.06 | > 0.05 | < 0.05 | > 0.05 |

Примечание. P_1 – сравнение данных при саркоме-180 с контролем; P_2 – сравнение данных при саркоме-180 с данными после лечения; P_3 – сравнение данных после лечения с контролем

При формировании солидной опухоли отмечается резкое статистически достоверное ($p < 0.01$) повышение уровня ТФИ и ДФИ. На этом фоне незначительно повышается абсолютное содержание монофосфоинозитидов ($p > 0.05$).

В мембранах гепатоцитов экспериментальных животных при саркоме-180 происходят глубокие изменения метаболизма изучаемых компонентов фосфоинозитидного цикла. Так, резкое накопление ТФИ и ДФИ при исследуемой патологии свидетельствует об активации фосфоинозитидного цикла, что характерно при опухолевой трансформации, когда потеря клетками

способности использовать защитные механизмы приводит к блокированию апоптоза [11].

Большой интерес представляют данные, касающиеся особенностей количественных и качественных изменений в спектре фосфоинозитидов мембран гепатоцитов после введения ВАС-167. На фоне более выраженного снижения МФИ нормализуются абсолютные уровни ТФИ и ДФИ, что, возможно, обусловлено деградацией этой фракции фосфоинозитидов (табл.1).

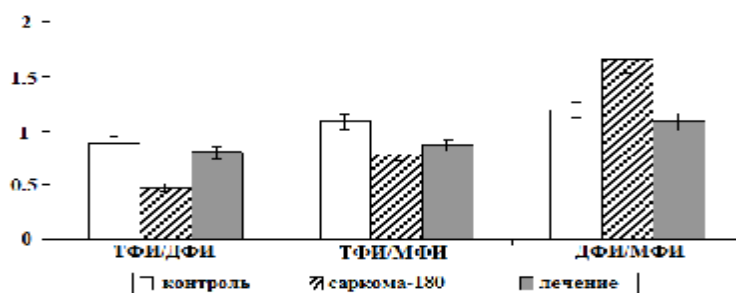


Рис. 1. Коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра фосфоинозитидов при саркоме-180 и после введения соединения ВАС-167 (в мкг Р на 1 г свежей ткани).

Анализ результатов, касающихся особенностей изменения величин коэффициентов соотношений отдельных фракций фосфоинозитидов, указывает на неоднозначность характера их изменений.

Так, при исследуемой патологии величины коэффициентов соотношений ТФИ/ДФИ и ТФИ/МФИ понижаются, тогда как коэффициент соотношения ДФИ/МФИ возрастает (рис.1), что свидетельствует об ускорении процесса деградации ТФИ и ДФИ. После введения производного 4-бутанолидов коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра фосфоинозитидов почти полностью нормализуются.

Таким образом, полученные нами данные являются доказательством нарушения регуляции фосфоинозитидного цикла при саркоме-180, следовательно, и фосфоинозитидной сигнальной системы, обеспечивающей транслокацию внешних сигналов, что позволяет контролировать такие кардинальные клеточные функции, как пролиферация и апоптоз. Нет сомнений, что вышеуказанные изменения в уровне важнейших компонентов этого каскада, в частности, липидных вторичных посредников могут приводить к нарушению деятельности функциональной активности биомембран, тем самым оказывая влияние на защитные механизмы и способствуя развитию злокачественных новообразований.

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

²Ереванский государственный университет

Ս. Ա. Կազարյան, Թ. Ր. Փանոսյան, Կ. Ի. Իսրաելյան, Թ. Վ. Կոչիկյան

**Роль ВАС-167 – производного 4-бутанолидов в регуляции метаболизма
фосфоинозитидов гепатоцитов при саркоме-180**

Исследовано содержание некоторых компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы мембран гепатоцитов при экспериментальной опухоли саркома-180. Установлено, что при этом происходит увеличение уровня моно-, ди- и трифосфоинозитидов, приводящее к нарушению коэффициентов их соотношений и деструктивным изменениям биомембран гепатоцитов. После применения соединения ВАС-167 наблюдается определенная нормализация уровня изучаемых компонентов биомембран.

Պ. Ա. Ղազարյան, Թ. Ր. Փանոսյան, Կ. Ի. Իսրայելյան, Տ. Վ. Ղոչիկյան

**ВАС-167' 4-բութանոլիդների ածանցյալի դերը հեպատոցիտների
ֆոսֆոինոզիտիդների փոխանակության կանոնավորման գործընթացում**

Ուսումնասիրվել են հեպատոցիտների թաղանթների ֆոսֆոինոզիտիդային ազդանշանային համակարգի որոշ բաղադրամասերի պարունակության փոփոխությունները փորձարարական սարկոմա-180-ի ժամանակ: Նաստարված է, որ այդ պայմաններում դիտվում են մոնո-, դի- և եռ-ֆոսֆոինոզիտիդների մակարդակների բարձրացում և դրանց հարաբերակցության գործակիցների փոփոխություններ: ВАС-167-ի օգտագործումից հետո տեսի է ունենում ուսումնասիրվող բոլոր ցուցանիշների որոշակի նորմավորում:

P. A. Ghazaryan, T. R. Panosyan, K. I. Israelyan, T. V. Ghochikyan

**The Role of ВАС-167 - Derived 4 Butanolid in the Regulation Process of Metabolism of
Phosphoinositides**

The content of some components of phosphoinositid signal system of hepatocytus membranes during experimental sarcoma-180 has been investigated. It has been found out that under such conditions there is a level increase of mono-, two- and triphosphoinositides that brings to coefficient abnormalities of their correlation, as well as to destructive modifications of hepatocytus biomembranes. After ВАС-167 using a difinitelevel normalization of examined components of biomembranes is observed.

Литература

1. Вересов В.Г., Кабак А.Г., Волотовский И.Д. - Биофизика. 2002. Т.47. N 1. С.31-37.
2. Шпаков А.О. - Вопросы онкологии. 2002. Т.48. С.644-654.
3. Шатская В.А., Красильников М.А., Павличенко О.В. - Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2007. N2. С. 206-210.
4. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Овчинникова Л.К. - Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2009. N 5. С.10-13.
5. Слюсарь Н.Н. Роль фосфоинозитидов и их метаболитов в онкогенезе. Докт. дис. СПб. 1993.
6. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2003. 150 с.
7. Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Феофанова Н.А. - Иммунология. 2009. N2. С.136-139.
8. Pendaries C., Tronchera H., Plantavid M., Payrastre B. - FEBS Lett. 2003. V.546. P. 25-31.
9. Toker A. - Cell. Mol. Life Sci. 2002. V.59. P.761-779.
10. Kingsbury S.R., Gout I.T. - Experimental Oncology. 2003. V.25. P.3-15.
11. Toretsky J.A., Thakar M., Eskenazi A.E., Frantz C.N. - Cancer Res. 1999. V.59. P.5745-5750.
12. Чернов В.А., Богомолова Н.С., Минакова С.М., Сускова В.С. - Фармакокинетика проспирина у крыс. Фармакокинетика и метаболизм лекарственных препаратов. М. 1978.
13. Ghazaryan P.A., Panosyan T.R., Ghochkyan T.V., Harutunyan V.S., Ghazaryan A. P. - Blood. 2010. V.1(10). P.24.
14. Зубер В.Л. Выделение полифосфоинозитидов. Методы биохимических исследований. (Учебное пособие под ред. Прохоровой М.И.) Л. 1982. С.72-80.
15. Казарян П.А., Элоян Д.В. - В кн.: Хроматографические методы. М. ЦОЛИУВ. 1982. С.28-40.