

БИОХИМИЯ

УДК 615.277.3, 543.852.6

П. А. Казарян^{1,2}, Г. М. Галоян²

Изучение транспортных АТФазных систем плазматических мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45 и после применения нового производного цианосодержащих лактонов

(Представлено чл.- кор. НАН РА А.А. Трчуняном 7/II 2014)

Ключевые слова: *саркома-45, активность АТФаз, противоопухолевая активность, новое производное цианосодержащих лактонов*

Прогресс в химиотерапии опухолевых заболеваний, в первую очередь, определяется разработкой и созданием новых противоопухолевых препаратов, что часто затруднено из-за высокой токсичности и избирательности действия биологически активных веществ. В этом плане особый интерес представляют ненасыщенные цианосодержащие лактоны – бутенолиды (ЦТБО), многие представители которых успешно применяются в онкологии [1]. Вместе с тем доказано, что одним из структурно-функциональных локусов, вовлекаемых в механизмы канцерогенеза различной этиологии, являются биомембраны [2-5].

Важнейшие достижения молекулярной биологии за последние годы связаны с изучением биологических мембран и транспортных АТФаз. Активность ферментных систем и характер липид-липидных соотношений в биомембранах может отражать способность клетки реагировать на происходящие в тканях и органах изменения при злокачественном росте и в динамике химиотерапии [2]. Транспортные АТФазы, встроенные в биологические мембраны, образуют ионные насосы, изучение которых является ведущей проблемой для целого ряда лабораторий, ей посвящены многочисленные исследования как в нашей стране, так и за рубежом [6-9].

Ранее нами было доказано, что опухолевый процесс и некоторые высокотоксичные противоопухолевые препараты оказывают положительное действие на структурно-функциональное состояние организма, в

частности, на мембранные структуры гепатоцитов и эритроцитов [9-11]. 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.

Цель настоящего исследования – изучение некоторых патогенетических механизмов развития опухолевого процесса при саркоме-45 и после применения ЦТБО (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид) путем исследования активности Na⁺/K⁺- и Mg-АТФаз в мембранах эритроцитов и гепатоцитов.

Материал и методы. Эксперименты проводились на 36 беспородных белых крысах-самцах линии Вистар массой 140-160 г, разделенных на три опытные группы. Первая контрольная группа состояла из 12 интактных животных. Животным второй и третьей группы (12 крыс в каждой) подкожно был перевиван штамм саркомы-45 [12]. Перевивку производили в стерильных условиях в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии ИТОХ НАН РА. Саркома-45 (С-45) – экспериментальная опухоль веретенчатого происхождения, полученная в результате введения диметилбензантрацена в подкожную клетчатку животных в 1957 г. (Е.Е. Погосянц). Штамм саркомы-45 был получен из опухолевого банка Онкологического научного центра МЗ РФ (Москва) [12].

Начиная с пятого дня перевивки, после регистрации роста опухоли, животные взвешивались, затем близкие по весу тела и размерам опухоли разделялись по группам. Животным третьей группы ежедневно в течение 8 дней вводился испытуемый препарат ЦТБО в виде крахмального раствора в дозе 17.5 мг/кг, обладающий противоопухолевой активностью [9-11].

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом на 15-й день опыта, исследуемые органы изолировались в холодных условиях (0-4⁰С). В наших опытах использовали мембраны эритроцитов и гепатоцитов, полученные общепринятыми методами дифференциального центрифугирования.

Активность АТФаз определяли по модифицированному методу Фиске и Собарроу, основанному на регистрации прироста неорганического фосфора в среде в ходе АТФазной реакции [13]. 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%-ного раствора ТХУ.

Активность Na⁺,K⁺-АТФазы изучали по разности между общей АТФазной активностью и активностью Mg-зависимой АТФазы. Активность ферментов выражали в мкг неорганического фосфора на 1 мг белка. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре 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 ЦТБО при внутрибрюшинном введении приводит к угнетению роста опухоли на 45.4%. По нашим данным, при С-45 наблюдаются значительные изменения активности липидзависимых и мембраносвязанных АТФаз как в эритроцитах, так и в гепатоцитах (рис. 1, 2). При этом в мембранах эритроцитов крови (рис.1) установлено резкое (почти четырехкратное), статистически достоверное ($p < 0.01$) увеличение Na/K-АТФазной активности с одновременным значительным (двукратным) снижением активности Mg-АТФазы.

После введения препарата ЦТБО в мембранах эритроцитов крови активность Na/K-АТФазы приближается к норме, хотя не доходит до уровня контрольных величин, а активность Mg-АТФазы продолжает снижаться.

Существенные изменения в активности АТФаз наблюдаются также в мембранах гепатоцитов при саркоме-45. Так, при этом активность Na/K-АТФаз достоверно ($p < 0.001$) снижается.

После внутрибрюшинного введения ЦТБО активность Na/K АТФаз в гепатоцитах приближается к норме. Примечательно, что в этих условиях активность Mg-АТФаз и общая АТФазная активность увеличиваются как при саркоме-45, так и после применения исследуемого препарата, что, по-видимому, связано с увеличением концентрации АТФ [10].

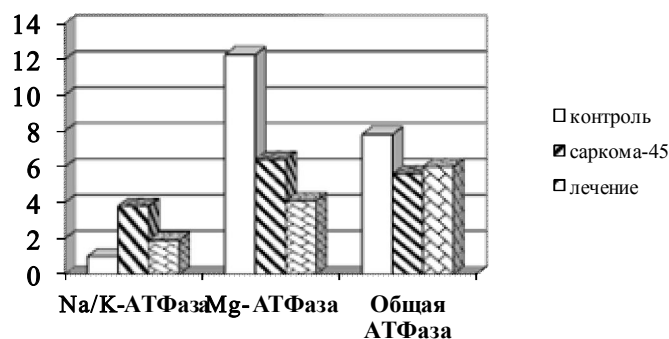


Рис. 1. Изменение активности АТФаз в мембранах эритроцитов крови крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка) и после применения ЦТБО.

По современным представлениям [5,14] изменение активности АТФаз главным образом связано с модификацией липидных компонентов биомембран, нарушением липид-липидных соотношений, 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 [3, 6].

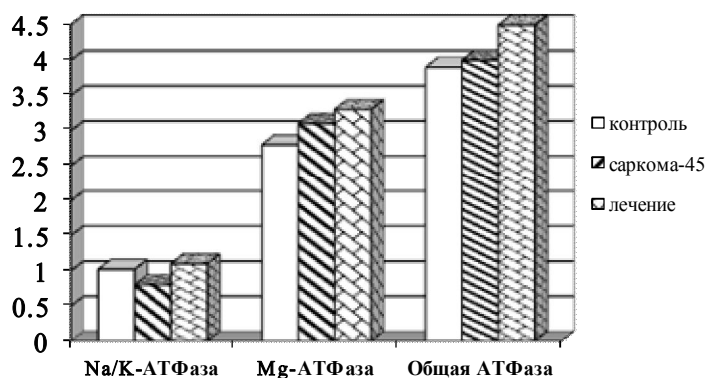


Рис. 2. Изменение активности АТФаз в гепатоцитах крыс при саркоме-45 (в мкг Фн/мг белка) и после применения ЦТБО.

Ранее нами были проведены также исследования по изучению активности процессов деградации фосфатидов-глицеридов биомембран, изменения адениновых нуклеотидов при С-45 и после применения ЦТБО [9, 10]. Установлено, что при С-45 в эритроцитах и гепатоцитах многократно повышаются коэффициент соотношения ЛФХ/ФХ и активность фосфолипазы A_2 . Наблюдается статистически достоверное снижение концентрации АТФ как в гепатоцитах, так и в мембранах эритроцитов [9-11].

Таким образом, саркома (С-45) характеризуется нарушением деятельности мембраносвязанных ферментов, обмена адениннуклеотидов и изменением качественного и количественного состава ФЛ биомембран. Наблюдаемые при этом нарушения липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений сопровождаются существенными изменениями со стороны важнейших функций мембранных образований, включая транспортные и мессенджерные процессы, рецепцию эндогенных метаболитически активных соединений, механизмы клеточных контактов. Это в свою очередь может явиться серьезной предпосылкой для нарушения функционального состояния биомембран при саркоме-45.

Полученные нами данные позволяют заключить, что ЦТБО характеризуется мембраностабилизирующим свойством в плане регуляции нарушенных метаболитических процессов при саркоме-45.

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

² Ереванский государственный университет

Ս. Ա. Կազարյան, Գ. Մ. Գալոյան

Изучение транспортных АТФазных систем плазматических мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45 и после применения нового производного циансодержащих лактонов

Установлено, что после применения нового производного 4-бутенолидов отмечается почти полная нормализация активности Na^+, K^+ - и Mg-АТФаз в мембранах как эритроцитов, так и гепатоцитов (за исключением активности Mg-АТФаз).

Պ. Ա. Ղազարյան, Գ. Մ. Գալոյան

Տրանսպորտային ԱԵՖազային ակտիվության ուսումնասիրությունը էրիթրոցիտների և հեպատոցիտների թաղանթներում սարկոմա-45-ի ժամանակ և ցիան խումբ պարունակող լակտոնների նոր ածանցյալի օգտագործումից հետո

Բացահայտված է, որ 4-բուտենոլիդների նոր ածանցյալի օգտագործումից հետո նկատվում է Na/K- և Mg-ԱԵՖազաների ակտիվության գրեթե լրիվ նորմավորում ինչպես էրիթրոցիտների, այնպես էլ հեպատոցիտների թաղանթներում (բացառությամբ Mg-ԱԵՖազային ակտիվության):

P. A. Ghazaryan, G. M. Galoyan

The Study of Transport ATPase Activity of Membranes of Erythrocytes and Hepatocytes in Sarcoma-45 and after Application Cyan Containing New Derivative of Lactones

It has been established that almost complete normalization of the activity of Na/K-, and Mg-ATPases in blood erythrocytes and hepatocytes membranes (except Mg-ATPase activity) is indicated after application of a new derivative of 4-butenolides.

Литература

1. *Аветисян А. А., Токмаджян Г. Г.* - Хим.журн. Армении. 1993. Т. 46. N 3-4. С. 219-236.
2. *Шанот В. С.* Биохимические аспекты опухолевого роста. Медицина. М. 1975. 304 с.
3. *Крепс Е. М.* - Липиды клеточных мембран. Л. Наука. 1981. 340 с.
4. *Владимиров Ю. А.* - Соросовский образовательный журнал. 2000. N6 (12). С.13-19.
5. *Ghazaryan P. A., Panosyan T. R., Ghochikyan T. V. et al.* - Blood. 2010. N1(10). P.25.
6. *Թռչունյան Ս. Ս.* - Կենսաբանական թաղանթներ, Ջանգալ - 97. Երևան, 2001, էջ 95-105.
7. *Болдырев А. А.* - СОЖ. 1998. N4. С. 2-9.

8. *Болдырев А. А.* - Современное состояние проблемы транспортных АТФаз и транспортные аденозинтрифосфатазы. М. МГУ. 1977. С. 115.
9. *Казарян П. А., Галоян Г. М., Аветисян А. А. и др.* – Вестник МАНЭБ. СПб. 2006. Т. 11. N8. Вып.2. С.261-264.
10. *Пепанян А. А., Казарян П. А., Аветисян А. А., Галоян Г. М. и др.* – Новое в геометрии и трансфузиологии, Киев. 2007. N6. С.112-120.
11. *Галоян Г. М., Казарян П. А., Саакян Л. С. и др.* – Кровь. Ереван. 2008. N2(8). С.53
12. *Першин Г. Н.* – В кн.: Методы в экспериментальной химиотерапии. М. Медицина. 1971. С. 364-365.
13. *Захарова Н. Б., Рубин В. И.* - Лабораторное дело. 1980. N12. С. 735-738.
14. *Надирадзе Н. И., Грекулова А. Н., Ковтарадзе В. Г.* - Бюл. эксперим. биол. и мед. 1993. Т. 125. N2. С. 135.