



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

**СДВИГИ В СОДЕРЖАНИИ ФОСФОЛИПИДОВ ЯДЕР КЛЕТОК
ТИМУСА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА**

А.Г. ОГАНЕСЯН

*Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики
biology@ysu.am*

Изучены изменения содержания общих фосфолипидов и их отдельных фракций ядер клеток тимуса крыс после 24-часового *in vivo* воздействия антиопухолевого препарата цисплатина. Показано, что воздействие цисплатина приводит к достоверному снижению общего содержания фосфолипидов ядер на 20 %. Из семи выявленных фракций фосфолипидов достоверно уменьшается содержание четырех: фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina и кардиолипина, в то время как изменения содержания сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидовой кислоты не достоверны.

Фосфолипиды – цисплатин – ядра клеток тимуса

Հետազոտվել է առնետների ուրցագեղձի բջջակորիզների ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների և նրանց առանձին ֆրակցիաների բաղադրությունը հակառուսոցային միացության՝ ցիսպլատինի 24-ժամյա *in vivo* ազդեցության ժամանակ: Ցույց է տրվել, որ ցիսպլատինը բերում է ֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր բաղադրության 20%-ով հավաստի նվազման: Ընդ որում, ֆոսֆոլիպիդների յոթ ֆրակցիաներից չորսի՝ ֆոսֆատիդիլինոզիտոլի, ֆոսֆատիդիլխոլինի, ֆոսֆատիդիլէթանոլամինի և կարդիոլիպինի բաղադրությունը հավաստիորեն նվազում է, իսկ սֆինգոմիելինի, ֆոսֆատիդիլսերինի և ֆոսֆատիդային թթվի քանակության փոփոխությունները հավաստի չեն:

Ֆոսֆոլիպիդներ – ցիսպլատին – ուրցագեղձի բջջակորիզներ

The content of total phospholipids and their individual fractions in rat thymus nuclei was studied. The *in vivo* action of antitumor agent cisplatin leads to decrease in total phospholipid content by 20%. The quantities of four phospholipid fractions (phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cardiolipin) are reliably decreased while the changes in content of sphingomyelin, phosphatidylserine and phosphatidic acid are not reliable.

Phospholipids – cisplatin – thymus cells nuclei

Известно, что платиновые соединения представляют важный класс антиопухолевых препаратов. В частности, цисплатин (cis-диаминдихлорплатин (II)) широко применяется в химиотерапии раковых заболеваний различной этиологии [6, 9, 13]. Первичной мишенью воздействия цисплатина является клеточное ядро, в особенности ДНК малигнизированных клеток, однако известно также, что повреждения наблюдаются не только в раковых, но и в нормально функционирующих клетках [5, 8]. Они затрагивают метаболические процессы, протекающие в ядрах, как в ядерных мембранах, так и во внутриядерных структурах, с участием различных компонентов ядра, в частности липидов [10, 11].

В настоящей статье приводятся результаты опытов по изучению изменений содержания и состава фосфолипидов ядерной фракции клеток тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина.

Материал и методика. Эксперименты проводились на беспородных крысах массой 120-150г. Цисплатин вводили внутривенно в концентрации 5 мг на 1000 г массы животного. Крыс декапитировали через 24 ч после введения препарата. Ядра клеток тимуса выделяли по методу Блобела и Потера [4]. Экстракцию фосфолипидов проводили по методу Блая и Дайера [3]. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках силикагеля L площадью 6x9 см², толщиной 5-7мм, с использованием разделительной смеси хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:24:4. После хроматографии пластинки сушили при 20⁰С и обрабатывали раствором 15,6%-ного CuSO₄ в 8%-ной фосфорной кислоте. Затем пластинки 15 мин держали при температуре 189⁰С. Количественное определение отдельных фракций фосфолипидов проводили денситометрированием компьютерной программой FUGIFILM Science Lab 2001 Image Gauge V 4.0. Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. В состав липидов ядер, помимо липидов – ядерных мембран, входят также липиды внутриядерных структур – хроматина и ядерного матрикса, играющих важную роль в основных функциях ядра. Содержание и состав липидов ядер, в том числе фосфолипидов (и в особенности фосфолипидов, связанных с ДНК, с хроматином и с ядерным матриксом) в опухолевых клетках значительно отличаются от таковых нормальных клеток [2, 12]. Изучение влияния анти-опухолевых препаратов на липидный состав ядер может иметь важное значение в выявлении специфических сдвигов в липидном метаболизме при малигнизации.

Опыты показали, что цисплатин заметно снижает количество общего фосфолипида через 24 ч после *in vivo* воздействия (рис.1), что свидетельствует о его подавляющем метаболизме липидов воздействию в ядрах клеток тимуса. Содержание общего фосфолипида уменьшается на 20% (рис.1).

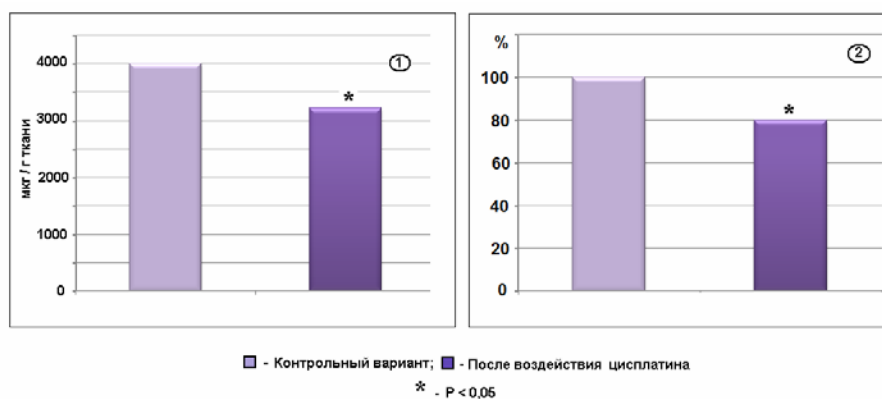


Рис.1. Количество общего фосфолипида в мкг/г ткани (1) и в процентах (2) в контроле и после воздействия цисплатина

Фракционирование выявило семь фракций фосфолипидов, из которых содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина составляют более 50% общего количества фосфолипидов ядер (табл.1). После воздействия цисплатина достоверно изменяется относительное количество и процентное содержание двух холинсодержащих фракций – фосфатидилхолина и сфингомиелина, при этом доля фосфатидилхолина уменьшается (34,6% в контроле и 30,1% после воздействия цисплатина), а сфингомиелина, наоборот, повышается (8,6% и 10,9% соответственно) (табл.1).

Табл. 1. Относительное количество и процентное содержание отдельных фракций фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс до и после воздействия цисплатина

#	Фосфолипиды	Контроль		Цисплатин	
		Количество, мкг	%	Количество, мкг	%
1	Фосфатидилсерин	3,00±0,19	6,0	3,65±0,40	7,3
2	Сфингомиелин	4,30±0,75	8,6	*5,45±0,50	10,9
3	Фосфатидилинозитол	3,50±0,30	7,0	3,50±0,50	7,0
4	Фосфатидилхолин	17,30±0,90	34,6	*15,05±0,60	30,1
5	Фосфатидилэтаноламин	11,30±0,50	22,6	11,00±0,40	22,0
6	Кардиолипин	3,40±0,12	6,8	3,50±0,20	7,0
7	Фосфатидовая кислота	7,20±0,70	14,4	7,85±0,90	15,7
	Сумма	50,00	100	50,00	100

*p<0.05

При определении абсолютного количества отдельных фосфолипидов наблюдаются достоверные сдвиги в четырех фракциях (табл.2). Наибольшие изменения содержания выявляются во фракциях фосфатидилхолина (уменьшение на 30%), в то время как уменьшение содержания фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и кардиолипина соответствует уменьшению количества общего фосфолипида ядер (уменьшение на 20%). Изменения абсолютного содержания сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидовой кислоты не достоверны (табл.2).

Табл. 2. Абсолютное количество (в мкг/г ткани) отдельных фракций фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс в контроле и после воздействия цисплатина

#	Фосфолипиды	Контроль	Цисплатин
		Количество, мкг	Количество, мкг
1	Фосфатидилсерин	240,0 ± 22,0	233,6 ± 25,6
2	Сфингомиелин	344,0 ± 30,0	348,8 ± 32,0
3	Фосфатидилинозитол	280,0 ± 14,0	*224,0 ± 11,9
4	Фосфатидилхолин	1384,0 ± 42,0	*963,2 ± 38,4
5	Фосфатидилэтаноламин	904,0 ± 40,0	*704,0 ± 25,6
6	Кардиолипин	272,0 ± 20,6	*224,0 ± 12,8
7	Фосфатидовая кислота	576,0 ± 56,0	502,4 ± 57,5
	Сумма	4000,0	3200,0

*p<0.05

Из этих сдвигов особого внимания заслуживает разнонаправленное изменение относительного содержания (доли) фосфатидилхолина и сфингомиелина (табл. 1), так как известно, что метаболические пути их синтеза пересекаются [2]. Заключительным этапом синтеза фосфатидилхолина является перенос фосфорилхолина на молекулу диацилглицерида, а при синтезе сфингомиелина – перенос того же фосфорилхолина на молекулу керамида [1]. Имеются данные, что в опухолевых клетках наблюдается гиперактивация фермента холинкиназы, ответственного за формирование фосфорилхолина, что способствует усилению метаболизма липидов при канцерогенезе. Показано также, что противоопухолевые, цитостатические препараты, в том числе цисплатин, ингибируют активность холинкиназы [1,7], тем самым подавляя формирование фосфорилхолина. Это может способствовать уменьшению содержания фосфатидилхолина, выявленному в наших экспериментах (табл. 2). Примечательно, что абсолютное содержание сфингомиелина практически не изменяется, а некоторое повышение доли сфингомиелина, видимо, является результатом более резкого подавления синтеза других фосфолипидных фракций, в особенности того же фосфатидилхолина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albi E., Cataldi S., Rossi G., Viola Magni M.* A possible role of cholesterol-sphingomyelin/phosphatidylcholine in nuclear matrix during rat liver regeneration. *J. Hepatol.*, 38, 623–628, 2003.
2. *Albi E., Lazzarini R., Viola Magni M.* Phosphatidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus. *Biochem. J.*, 410, 1-31, 2008.
3. *Bligh E.G., Dyer W.J.*, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Biochem. Physiol.*, 37, 911-917, 1959.
4. *Blobel G., Potter V.R.* Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154, 76-79, 1966.
5. *Boulikas T., Vougiouka M.* Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review). *Oncology reports*, 10, 1663-1682, 2003.
6. *Florea A.-M., Busselberg D.* Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3, 1351-1371, 2011.
7. *Gault C.R., Obeid L.M., Hannun Y.A.* An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 688, 1-23, 2010.
8. *Gonzalez V.M., Fuertes M.A., Alonso S., Perez J.M.* Is cisplatin-induced cell death always preceded by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, 59, 657-663, 2001.
9. *Miller R.P., Tadagavadi R.K., Remesh G., Reeves W.B.* Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2, 2490-2518, 2010.
10. *Speelmans G., Sips W.H.H.M., Grisel R.J.H., Staffhorst R.W.M., Fichtinger-Schepman A.M.J., Reedijk J., de Kruijff B.* The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1283, 60-66, 1996.
11. *Speelmans G., Staffhorst R.W.M., Versluis K., Reedijk J., de Kruijff B.* Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*, 36, 10545-10550, 1997.
12. *Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B.* Structural and functional aspects of nuclear lipids in normal and tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*, 65, 5, 620-643, 2000.
13. *Xin Y., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K.* Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am. J. Med. Sci.*, 334, 2, 115-124, 2007.

Поступила 03.04.2013