

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

**ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ԱԳԱՊԻ ԳԵՎՈՐԳԻ**

ԱՌՆԵՏԻ ԼԅԱՐԴԻ ԵՎ ՈՒՐՑԱԳԵՂԶԻ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ԿՈՐԻԶՍՅԻՆ  
ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅԱՆ  
ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑԻՍՊԼԱՏԻՆԻ *IN VIVO* ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ  
ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.04. – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

**Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր**

ԵՐԵՎԱՆ 2014

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**ОГАНЕСЯН АГАПИ ГЕВОРКОВНА**

**ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК  
ПЕЧЕНИ И ТИМУСА КРЫС ПРИ *IN VIVO* ВОЗДЕЙСТВИИ  
ЦИСПЛАТИНА**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կենս.գիտ.  
դոկտոր, պրոֆեսոր Է.Ս.Գևորգյան  
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր  
Ս.Պ.Հովհաննիսյան  
կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր  
Գ.Ս.Վարդանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական(Սլավոնական) համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. դեկտեմբերի 23-ին, ժամը 14<sup>00</sup>ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմնագիրն առաքված է 2014թ. նոյեմբերի 21-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս.գիտ.թեկնածու, դոցենտ Մ.Ա.Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.

Научный руководитель: доктор биол.наук, профессор,  
член-корреспондент НАН РА,  
Э.С.Геворкян  
Официальные оппоненты: доктор биол.наук, профессор  
С.П.Оганесян  
доктор биол.наук, профессор  
Г.С.Варданян

Ведущая организация: Российско-Армянский(Славянский)  
университет

Защита диссертации состоится 23 декабря 2014 года, в 14<sup>00</sup> часов, на заседании Специализированного совета 051 по биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул.Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 21 ноября 2014 года.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
кандидат биологических наук, доцент

М.А.Парсаданян

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы** Цисплатин был обнаружен случайно биофизиком Розенбергом, изучающим воздействие электромагнитного поля на рост бактериальной клетки и обнаружившим, что подавление деления клеток *E.coli* имеет место за счет продуктов электролиза с поверхности платинового электрода [Rosenberg et al., 1965]. Было высказано предположение, что цисплатин сможет подавлять также деление быстроделящихся опухолевых клеток, что скоро было показано ими же [Rosenberg et al., 1969]. Начиная с 1978 года цисплатин, как в отдельности, так и в комбинации с другими антиопухолевыми препаратами, широко используется в клинике как высокоэффективное вещество в лечении целого ряда раковых заболеваний. Основной мишенью антиопухолевого воздействия цисплатина (*cis*-diaminedichlorplatinum) является клеточное ядро, а точнее – ДНК, в двойной спирали которой цисплатин образует межнитиевые сшивки. Последние препятствуют делению клетки, так как нити ДНК не могут разойтись. По мнению большинства исследователей, именно в этом проявляется повреждающее структуру ДНК и ингибирующее ее синтез действие цисплатина, приводящее к гибели раковых клеток [Basu, Krishnamurthy, 2010, Swift, Golsteyn, 2014]. Во многих работах выявлены заметные сдвиги в структуре и свойствах ДНК при *in vitro* воздействии цисплатина [Ho et al., 1984, Bancroft et al., 1990, Арутюнян и др., 1997, Dalyan et al., 2003, Novakova et al., 2005, Lando et al., 2013]. Вместе с тем известно, что менее 1% общего количества платинового соединения клетки обнаруживается в комплексе с ДНК и корреляция между цисплатин-зависимой гибелью клеток и платинированием ДНК не четко выражена [Burger H. et al, 1997]. Более того, было показано также, что цисплатин способен индуцировать апоптотический сигнал, не связанный с ядром [Mandic et al., 2003]. В литературе накопилось большое количество данных, свидетельствующих о взаимодействии цисплатина также с другими компонентами ядра и ядерной мембраны, с митохондриальной ДНК и мембраной митохондрий, о цисплатиновой активации процессов апоптоза и некроза в различных тканях и т.д. [Miller et al., 2010, Basu, Krishnamurthy, 2010, Florea, Busselberg, 2011]. Таким образом, будучи цитотоксическим препаратом, цисплатин оказывает заметное отрицательное воздействие на разнообразные процессы, протекающие как в ядре, так и в клетке в целом.

Именно поэтому применение цисплатина в химиотерапии ограничено. Такие побочные эффекты, как повреждающее воздействие на почки, периферическую нервную систему, желудочно-кишечный тракт, костный мозг и другие ткани, могут привести к апоптотической гибели клеток указанных тканей [Boulikas, 2007]. Вместе с тем, невзирая на высокую цитотоксичность препарата, у опухолевых клеток со временем развивается прогрессирующая резистентность к его действию, и в процессе лечения нередко прибегают к увеличению вводимой дозы цисплатина, что крайне нежелательно из-за необратимого повреждения здоровых тканей и органов впоследствии такой «агрессивной» химиотерапии. С целью уменьшения нежелательных побочных влияний препарата и повышения его эффективности

цисплатин в клинике используется в комбинации с другими соединениями [ Ohta et al., 2006, Quinqin et al., 2014].

За последние годы протестировано большое количество различных платиновых соединений, производных цисплатина, с целью обнаружения менее токсичного, и вместе с тем, такого-же эффективного антиопухолевого препарата как цисплатин. Однако и сегодня цисплатин остается наиболее востребованным. Следовательно, дальнейшее изучение *in vivo* воздействия цисплатина на различные компоненты клеток и, в особенности, ядра, на процессы, протекающие в них, представляет определенный интерес в аспекте выявления причин побочных эффектов и повышения эффективности воздействия препарата.

Успешное развитие липидологии в конце 20-ого века установило, что липиды являются не только основным элементом ядерных мембран, но и важным компонентом таких внутриядерных структур, как хромосома [Gahan et al., 1987], хроматин [Казначеев и др., 1984, Геворкян и др., 1985, Алесенко и др., 1989] и ядерный матрикс [Алесенко и др., 1982, 1983, Геворкян и др., 1987, Cocco et al., 1987]. При этом были обнаружены ДНК-связанные липиды, играющие важную роль в структурно-функциональной организации хромосомальной ДНК нормальных и раковых клеток [Balint, Holczinger, 1979, Стручков, Стражевская, 1990, 1993]. Примечательно, что ДНК-связанные липиды принимают участие в петлевой укладке и конформационных переходах ДНК, в ее контактах с ядерным матриксом, а также являются чувствительными мишенями противоопухолевых препаратов на уровне организма [Стручков, Стражевская, 1993]. Вышеотмеченное, а также наличие в ядре фосфолипаз [Геворкян и др., 1986], липид-зависимой протеинкиназы С [Chuang et al., 1987] и всех компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы [Martelli et al., 1999, 2003, Cocco et al., 2004, Redondo-Munoz et al., 2013] свидетельствуют о важной структурно-функциональной роли липидов ядерной мембраны и внутриядерных структур как в нормально функционирующих, так и в раковых клетках.

С этой точки зрения всестороннее изучение сдвигов в липидах ядер и внутриядерных структур в тканях крыс при *in vivo* воздействии противоопухолевого препарата цисплатина несомненно актуально и представляет определенный научно-практический интерес.

**Цель и задачи исследования** Целью диссертационной работы явилось подробное изучение качественных и количественных изменений во фракциях липидов ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток двух метаболически заметно отличающихся тканей – печени и тимуса крыс при *in vivo* воздействии противоопухолевого препарата цисплатина. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Определение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток печени и тимуса крыс под воздействием цисплатина.
2. Выявление качественных и количественных сдвигов во фракциях фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс под воздействием цисплатина.

3. Выявление качественных и количественных сдвигов во фракциях фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах ядерного матрикса печени и тимуса крыс под воздействием цисплатина.
4. Выявление качественных и количественных сдвигов во фракциях фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах хроматина печени и тимуса крыс под воздействием цисплатина.
5. Изучение изменений во фракциях полифосфоинозитидов в препаратах ядерной мембраны клеток печени и тимуса крыс под воздействием цисплатина.

**Научная новизна и практическая ценность** Выявлено достоверное снижение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов в изолированных ядрах клеток печени и тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина, что указывает на заметное подавление метаболизма липидов ядер антиопухолевым препаратом. Показано, что снижение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов ядер наблюдается как в препаратах ядерной мембраны, где сосредоточена большая часть липидов ядер, так и в препаратах внутриядерных структур: ядерного матрикса и хроматина, причем примерно в равном процентном соотношении. Последняя закономерность нарушается при изучении количественных и качественных изменений отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов ядерных мембран и внутриядерных структур.

Показано также, что цисплатин достоверно уменьшает количество почти всех фракций фосфолипидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс, причем наибольшее уменьшение наблюдается в количестве сфингомиелина на фоне незначительных изменений количества фосфатидилхолина. Эти результаты указывают на возможное воздействие цисплатина на перекрестный механизм взаимопревращения: фосфатидилхолин - сфингомиелин, протекающий в ядре и описанный многими авторами [Plathow et al., 2008, Albi et al., 2008, 2009, 2013]. Цисплатин заметно сдвигает функционирование механизма, осуществляющего перенос фосфохолина с молекулы сфингомиелина на молекулу фосфатидилхолина, что несомненно будет сказываться на количестве внутриядерных сигнальных молекул. Показано также достоверное снижение количества всех фракций нейтральных липидов как в препаратах ядерных мембран печени, так и тимуса крыс, что также свидетельствует о значительном воздействии цисплатина на процессы метаболизма липидов в ядрах.

Выявлено достоверное снижение количества отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах внутриядерных структур – ядерного матрикса и хроматина клеток печени и тимуса крыс. Наиболее интересные результаты выявляются при изучении относительного количества холинсодержащих фосфолипидов во внутриядерных структурах клеток печени и тимуса крыс. При этом впервые показано, что в клетках печени и тимуса наблюдаются разнонаправленные сдвиги относительного количества фосфатидилхолина и сфингомиелина в препаратах внутриядерных структур. Если соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин в препаратах ядерного матрикса и хроматина заметно повышается в клетках печени, то оно резко уменьшается в клетках тимуса

крыс. Показано также, что цисплатин приводит к однонаправленным количественным сдвигам во всех фракциях нейтральных липидов внутриядерных структур клеток обеих тканей. При этом, уменьшение количества наблюдается во всех выявленных фракциях, что свидетельствует об универсальном характере воздействия противоопухолевого препарата на лабильносвязанные и прочносвязанные с ДНК нейтральные липиды ядерного матрикса и хроматина.

С целью выяснения возможности воздействия цисплатина на функционирование фосфоинозитидного регуляторного механизма в ядре изучен состав полифосфоинозитидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина. Впервые показано, что введение противоопухолевого препарата приводит к снижению количества монофосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс и повышению содержания трифосфоинозитидов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на фоне подавления липидного метаболизма в ядерных мембранах, что сопровождается снижением количества почти всех фракций фосфолипидов, соотношение трифосфоинозитид/монофосфоинозитид заметно повышается. Это означает, что антиопухолевое вещество цисплатин может воздействовать на функционирование фосфоинозитидного метаболического пути в ядрах клеток печени и тимуса крыс.

Вышеприведенные результаты, имеющие теоретическое значение, важны в аспекте дальнейшего изучения механизма *in vivo* воздействия цисплатина на метаболизм липидов ядер в целом и, в особенности, ядерных мембран и внутриядерных структур. Они имеют также важное практическое значение исходя из прямого назначения цисплатина, как одного из основных химиотерапевтических агентов при лечении опухолей. Выявление как универсальных, так и специфических изменений в метаболизме липидов ядерных мембран и внутриядерных структур, сдвигов в функционировании липид-зависимых регуляторных механизмов в ядрах, несомненно, будут способствовать уменьшению нежелательных побочных влияний цисплатина при химиотерапии и повышению его эффективности.

**Апробация работы** Основные результаты исследований представлены на заседании кафедры биофизики Ереванского государственного университета, а также на следующих международных конференциях: Международная студенческая биологическая конференция (Ереван, 2009), Международная конференция “Биотехнология и здоровье-3” (Ереван, 2009), Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология 21-го века” (Пущино, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012), “The 16<sup>th</sup> Conversation on Biomolecular Structure and Dynamics” (Albany, 2009), “ISCO Congress on Cellular Oncology (Dresden, 2010), “8<sup>th</sup> EBSA, European Biophysics Congress” (Budapest, 2011), “The EMBO meeting, advancing the life sciences” (Amsterdam, 2013), E. book of FEBS Congress 2014, The FEBS Journal ( France, 2014).

**Публикации** По теме диссертации опубликованы 9 статей и 12 тезисов.

**Объем и структура работы** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы, насчитывающего 132 наименования. Диссертация изложена на 126 страницах, включает 27 рисунков и 29 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** кратко описывается актуальность темы, обсуждаются цель, задачи, научно-практическое значение и структура диссертационной работы.

**Первая глава** посвящена обзору литературных данных, относящихся к современным представлениям о механизме действия антиопухолевого препарата цисплатина и о функциях и роли липидов ядер и внутриядерных структур. Краткое содержание остальных глав приводится ниже.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на половозрелых (100-150г) белых крысах обоего пола. В работе использовали противоопухолевый препарат цисплатин (cis-diaminedichlorplatinum фирмы Sigma, США). Для инъекции использовали водный раствор цисплатина. Препарат вводили внутривентриально в количестве 5 мг на 1000 г массы животного. Животных декапитировали через 24 часа после введения цисплатина в условиях легкой эфирной анестезии.

**Выделение ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина из клеток печени и тимуса крыс.** Препараты ядер клеток печени крыс выделяли по методу Блобела и Потера [Blobel and Potter, 1966], а из клеток тимуса - по методу Олфрея и соавторов [Alfrey et al., 1957]. Препараты ядерных мембран из очищенных ядер клеток обеих тканей выделяли по методу Березни и соавторов [Berezney et al., 1970], препараты ядерного матрикса - по методу Березни и Кофи [Berezney and Coffey, 1976], а препараты хроматина - по методу Уманского и соавторов [Umansky et al., 1975].

**Экстракция липидов.** Экстракцию липидов из полученных препаратов ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток печени и тимуса крыс проводили по методу Блая и Дайера [Bligh and Dyer, 1959]. Кислотную экстракцию полифосфоинозитидов из остатка после удаления липидов из препаратов ядер и ядерных мембран обеих тканей проводили по методу Бергельсона и соавторов [Бергельсон и др., 1981].

**Фракционирование липидов методом микротонкослойной хроматографии.** Для фракционирования липидов пользовались методом микротонкослойной хроматографии на пластинках размером 6x9 см<sup>2</sup>, с толщиной слоя силикагеля 5-7 мкм. [Бергельсон и др., 1981]. Для разделения фосфолипидов и нейтральных липидов использовали пластинки с силикагелем L, а фракционирование полифосфоинозитидов проводили на пластинках с силикагелем КСК, импрегнированным 1% оксалатом натрия [Бергельсон и др., 1981]. Для фракционирования фосфолипидов использовали смесь хлороформ-метанол-дистиллированная вода в соотношении 65:25:4, а для разделения нейтральных липидов - смесь петролейный эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота в соотношении 40:10:1. Фракционирование полифосфоинозитидов проводили смесью хлороформ-метанол-4N NH<sub>4</sub>OH, в соотношении 9:7:2.

**Обнаружение фракционированных липидов.** Для проявки фосфолипидов использовали 15.6 % раствор  $\text{CuSO}_4$ , приготовленный на 8%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , а для обнаружения нейтральных липидов и полифосфоинозитидов - 10% раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , которыми опрыскивали пластинки с разделенными липидами. После обработки соответствующей смесью, пластинки нагревали 15-20 мин при 150-180°C. Фосфолипиды обнаруживаются в виде темно-коричневых пятен, а нейтральные липиды и полифосфоинозитиды обнаруживаются в виде черных пятен на белом фоне. Цифровые фотографии пластинок с фракционированными и проявленными липидами использовали для их количественной оценки. Определение количества фракционированных липидов проводили по специальной компьютерной программе FUGIFILM Science Lab. 2001 Image Gauge V 4.0., предназначенной для денситометрирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Изменения общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток печени и тимуса крыс**

Ядро клетки является местом активного метаболизма липидов. Ядро обладает набором ферментов, обеспечивающих метаболические процессы липидного обмена [Albi, Viola Magni, 2004, Alesenko, et al., 2002, Struchkov et al., 2002]. Метаболиты обмена некоторых липидов, в качестве вторичных мессенджеров, играют важную роль в трансдукции сигналов на уровне ядра [Albi et al., 2004, Irvine, 2003].

Известно, что в малигнизированных клетках усиливаются все метаболические процессы, в том числе и метаболизм липидов [Plathow et al., 2008, Rebillard et al., 2007]. Показано, что содержание и состав липидов ядер, и, в особенности, фосфолипидов, связанных с ДНК, хроматином и ядерным матриксом опухолевых клеток, значительно отличаются от таковых нормальных клетках [Albi et al., 2008, Struchkov et al., 2002, Стручков и др., 2000].

Известно также, что цисплатин способен угнетать метаболизм липидов путем воздействия на активность разных ферментов, обеспечивающих их обмен [Plathow et al., 2008]. Изучение влияния антиопухолевого препарата на липидный состав ядер может иметь важное значение в выявлении специфических сдвигов в липидном метаболизме при малигнизации.

В первом разделе диссертационной работы приводятся результаты опытов по изучению количественных изменений общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов как в препаратах ядер, так и ядерных мембран и внутриядерных структур – ядерного матрикса и хроматина клеток печени и тимуса крыс до и после воздействия цисплатина. Опыты показали, что количество общих фосфолипидов ядерных фракций различных тканей различно. Содержание общих фосфолипидов и нейтральных липидов в ядерной фракции тимуса чуть больше (4000 мкг/г ткани и 3100,2 мкг/г ткани, соответственно), чем в препаратах печени, где содержание тотальных фосфолипидов составляет 3700 мкг/г ткани, а нейтральных

липидов - 2684,2 мкг/г ткани. *In vivo* воздействие цисплатина приводит к снижению содержания как фосфолипидов, так и нейтральных липидов клеток обеих тканей крыс (табл. 1). Известно, что фосфолипиды и нейтральные липиды играют важную роль во многих функциях ядра, и, следовательно, любые изменения в их содержании могут быть важными при исследовании механизмов антиракового воздействия цисплатина. Полученное достоверное уменьшение их содержания свидетельствует об угнетении метаболизма липидов при *in vivo* воздействии цисплатина.

Достоверное уменьшение содержания как общих фосфолипидов, так и общих нейтральных липидов наблюдается также в препаратах ядерных мембран, выделенных из клеток обеих тканей, причем почти в равной степени (на 20-24%, табл. 1). Приведенные выше результаты показывают, что подавление метаболизма липидов в ядрах и ядерных мембранах универсально в клетках обеих тканей и не затрагивает особенности метаболических процессов, протекающих в клетках печени и тимуса крыс.

Уменьшение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов после воздействия цисплатина наблюдается также во внутриядерных структурах – в препаратах ядерного матрикса и хроматина, где липиды представлены в минорных количествах (табл. 1). Известно, что ядерный матрикс является каркасом, который обеспечивает морфологическую целостность ядра. Хотя ядерный матрикс состоит преимущественно из негистоновых белков и содержит в незначительных количествах ДНК, РНК, фосфолипиды, нейтральные липиды [Struchkov et al., 2000, Шеваль и др., 2010], он играет важную роль в процессах репликации ДНК, процессинга, синтеза РНК и т.д. [Wilson et al., 2013]. Учитывая, что изменения содержания даже минорных компонентов ядерного матрикса могут привести к изменениям функциональной активности ядра [Albi et al., 2009, 2013, Шеваль и др., 2010], полученное в наших экспериментах уменьшение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов в клетках печени (на 24-25%) и тимуса (на 15-18%) крыс приобретает определенную значимость (табл. 1).

В настоящее время считается доказанным, что примерно 10% ядерных липидов локализовано в хроматине [Albi et al., 2004]. Во многих работах доказана также важная роль этих минорных компонентов хроматина в регуляции репликации и транскрипции [Геворкян и др., 1985, Алесенко и др. 1989, Alesenko et al., 2002, Irvine 2003, Albi et al., 2004]. Известно, что содержание липидов хроматина может изменяться в различных стадиях жизнедеятельности клеток. В зависимости от концентрации, липиды могут стабилизировать или дестабилизировать молекулу ДНК [Goto et al., 2006, Luo et al., 2006, Кубатиев и др., 2004, Жданов и др., 2008]. Известно, что основной компонент хроматина - ДНК является главной мишенью цисплатина в ядре при химиотерапии опухолевых заболеваний, однако уменьшение содержания таких минорных компонентов хроматина, как липиды, может вызывать побочные эффекты, изменяя эффективность воздействия антиопухолевого препарата. Результаты опытов по определению содержания липидов в препаратах хроматина клеток печени и тимуса крыс до и после воздействия цисплатина выявили достоверное подавление количества фосфолипидов и нейтральных липидов

как в препаратах хроматина печени (на 25-26%), так и тимуса крыс (на 31-36%) (табл. 1).

Таблица 1. Содержание фосфолипидов и нейтральных липидов (в мкг на 1 г ткани) в препаратах ядер, ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина печени и тимуса крыс до и после *in vivo* воздействия Цисплатина.

|                  | П Е Ч Е Н Ь   |                |                    |                | Т И М У С     |                |                    |                |
|------------------|---------------|----------------|--------------------|----------------|---------------|----------------|--------------------|----------------|
|                  | Фосфолипиды   |                | Нейтральные липиды |                | Фосфолипиды   |                | Нейтральные липиды |                |
|                  | Контроль      | Цисплатин      | Контроль           | Цисплатин      | Контроль      | Цисплатин      | Контроль           | Цисплатин      |
| Ядра             | 3700,00±16,60 | *3330,00±77,00 | 2684,20±22,70      | *2233,00±17,40 | 4000,00±90,00 | *3216,00±80,00 | 3100,20±70,0       | *2130,00±60,00 |
| Ядерные мембраны | 1450,00±61,50 | *1110,00±51,30 | 970,00±4,10        | *740,00±3,54   | 1160,00±75,30 | *930,00±31,30  | 770,00±50,20       | *620,00±20,30  |
| Ядерный матрикс  | 67,20±2,60    | *50,00±1,43    | 47,00±1,68         | *35,70±1,68    | 250,00±8,75   | *205,00±6,38   | 164,00±5,77        | 140,00±2,40    |
| Хроматин         | 98,00±2,60    | *72,73±0,35    | 61,33±1,70         | *45,88±0,23    | 121,38±9,30   | *84,70±4,20    | 53,30±5,00         | *34,00±2,00    |

Таким образом, проведенные в первом разделе исследования показали, что содержание общих фосфолипидов и нейтральных липидов в препаратах ядер клеток печени и тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина указывает на заметное подавление метаболизма липидов ядер антиопухолевым препаратом. Уменьшение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов ядер наблюдается как в препаратах ядерной мембраны, где сосредоточена большая часть липидов ядер, так и в препаратах внутриядерных структур: ядерного матрикса и хроматина, причем примерно в равном процентном соотношении.

### **Сдвиги в составе отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс при *in vivo* воздействии цисплатина**

Фракционирование фосфолипидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс до и после воздействия цисплатина проводили методом микротонкослойной хроматографии с последующим денситометрированием и определением содержания отдельных фракций. В препаратах ядерных мембран обеих тканей было обнаружено семь фракций фосфолипидов. Основными фракциями являлись фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, суммарное процентное содержание которых составляло примерно 60% от общего количества фосфолипидов. Фосфатидовая кислота и кардиолипин являлись минорными фракциями препаратов ядерных мембран исследуемых тканей (табл. 2).

Содержание пяти фракций из семи достоверно уменьшается, в то время как изменения содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина недостоверны (табл.2).

Таблица 2. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций фосфолипидов ядерных мембран клеток печени и тимуса до и после воздействия цисплатина.

| N | Фосфолипиды          | Ядерные мембраны клеток печени крыс |                              | Ядерные мембраны клеток тимуса крыс |                              |
|---|----------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
|   |                      | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина |
| 1 | Фосфатидилсерин      | 137,75±5,84                         | *104,34±4,82                 | 121,80±7,91                         | *80,91±2,72                  |
| 2 | Сфингомиелин         | 217,50±9,23                         | *111,00±5,13                 | 179,80±11,67                        | *74,40±2,50                  |
| 3 | Фосфатидилинозитол   | 134,85±5,72                         | *95,46±4,41                  | 100,92±6,55                         | *90,21±3,04                  |
| 4 | Фосфатидилхолин      | 500,25±21,22                        | 466,20±21,55                 | 388,60±25,23                        | 372,00±12,52                 |
| 5 | Фосфатидилэтаноламин | 358,15±15,20                        | *257,52±11,90                | 286,52±18,60                        | 264,12±8,89                  |
| 6 | Кардиолипин          | 58,00±2,46                          | *39,96±1,85                  | 49,88±3,24                          | *27,90±0,94                  |
| 7 | Фосфатидовая кислота | 43,50±1,85                          | *35,52±1,64                  | 32,48±2,11                          | *20,46±0,69                  |
|   | Суммарное содержание | 1450,00±61,50                       | *1110,73±51,30               | 1160,00±75,30                       | *930,00±31,30                |

\*P < 0,05

Примечательно значительное уменьшение содержания сфингомиелина по сравнению с контрольным вариантом в исследуемых препаратах ядерных мембран клеток печени примерно на 50% и тимуса на 58,6%. По сравнению с контрольным вариантом наблюдается также осязаемое снижение содержания кардиолипина на 31% в препаратах ядерных мембран клеток печени и на 44% в ядерных мембранах клеток тимуса, а также содержания фосфатидовой кислоты – потенциального предшественника всех фосфоглицеридов (на 17% в клетках печени и на 37% в клетках тимуса). Эти результаты подтверждают сделанный в первом разделе работы вывод о заметном угнетении метаболизма липидов ядер *in vivo* воздействием антиопухолевого препарата цисплатина.

Особого внимания заслуживают сдвиги в количестве холинсодержащих фосфолипидов – фосфатидилхолина и сфингомиелина. На фоне значительного уменьшения содержания сфингомиелина в препаратах ядерных мембран обеих тканей наблюдаются недостоверные изменения содержания фосфатидилхолина (табл.2). Эти результаты указывают на то, что помимо подавления общего метаболизма липидов в ядрах, цисплатин может воздействовать на перекрестный механизм взаимопревращения: фосфатидилхолин-сфингомиелин, протекающий в ядре [Albi et al., 2008]. Известно, что в завершающей фазе синтеза фосфатидилхолина и сфингомиелина при участии соответствующих ферментов происходит перенос фосфохолина или на молекулу диацилглицерида (синтез фосфатидилхолина), или на молекулу церамида (синтез сфингомиелина) [Plathow et al., 2008, Albi et al., 2009, 2013]. Метаболические пути синтеза фосфатидилхолина и сфингомиелина сопряжены и протекают согласованно, в результате чего регулируется содержание внутриядерных сигнальных молекул – церамида и диацилглицерида [Albi et al., 2007, 2009, 2013]. Таким образом, воздействие антиопухолевого препарата может привести к изменению регуляторных функций микродоменов ядерных мембран, что скажется на статусе ядерно-цитоплазматических взаимоотношений.

Наряду с почти идентичным уменьшением суммарного содержания фосфолипидов в исследуемых препаратах после воздействия цисплатина, липиды ядерных мембран клеток изученных тканей проявляют различную чувствительность к химиотерапевтическому агенту. Так, в препаратах ядерных мембран клеток печени крыс содержание фосфатидилэтанолamina сокращается на 29%, в то время, как в тимусе оно остается почти неизменным (рис.2). Различия проявляются также в изменении содержания отдельных фракций фосфолипидов. Сокращение содержания фосфатидилинозитола в исследуемых препаратах печени составляет 29%, в то время, как в тимусе содержание данного фосфолипида уменьшается всего на 10,6% (табл.2). Зарегистрированные различия, по видимому, обусловлены особенностями метаболических процессов, протекающих в клетках исследуемых тканей.

В таблице 3 приведены результаты фракционирования нейтральных липидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс. В препаратах ядерных мембран клеток как печени, так и тимуса выявляются шесть фракций нейтральных липидов, среди которых доминируют фракции холестерина и его эфиров (вместе – примерно 53% в обеих тканях) и свободных жирных кислот (23-25%), в то время как

содержание трех фракций ацилглицеридов в сумме составляет лишь 22-24% (табл.3). *In vivo* воздействие цисплатина приводит к достоверному уменьшению содержания всех шести фракций нейтральных липидов в обоих препаратах ядерной мембраны, однако, вместе с тем, наблюдаются незначительные различия в процентном соотношении некоторых фракций. Так, обнаруживается повышение доли эфиров холестерина и свободных жирных кислот в препаратах мембран клеток обеих тканей до 3-4%, однако оно не достоверно и не может быть объяснено специфическим воздействием химиотерапевтического агента.

Таблица 3. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций нейтральных липидов ядерных мембран клеток печени и тимуса до и после воздействия цисплатина.

| N | Нейтральные липиды | Ядерные мембраны клеток печени крыс |                              | Ядерные мембраны клеток тимуса крыс |                              |
|---|--------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
|   |                    | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина |
| 1 | Холестерин         | 358,90±14,35                        | *227,92±10,90                | 296,45±19,33                        | *212,04±8,16                 |
| 2 | Эфиры хол.         | 158,11±6,68                         | *133,94±9,03                 | 113,96±5,42                         | *97,96±2,40                  |
| 3 | С.Ж.К              | 240,56±11,00                        | *210,16±8,85                 | 174,79±10,79                        | *158,10±3,55                 |
| 4 | МАГ                | 93,12±3,94                          | *72,52±1,77                  | 77,00±5,12                          | *63,24±2,07                  |
| 5 | ДАГ                | 65,96±3,61                          | *54,02±1,66                  | 69,30±5,52                          | *58,90±1,93                  |
| 6 | ТАГ                | 53,35±1,44                          | *41,44±3,19                  | 38,50±4,02                          | *29,76±2,19                  |
|   | Суммарное сод.     | 970,00±41,00                        | *740,00±35,40                | 770,00±50,20                        | *620,00±20,30                |

\*P<0.05

Таким образом, результаты, описанные в данной главе свидетельствуют о том, что противоопухолевые эффекты цисплатина сопровождаются заметными количественными и качественными сдвигами в содержании отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс, что, по-видимому, характеризует измененный воздействием препарата статус липидного метаболизма в ядрах, способствующий восстановлению нормального метаболизма клеток в целом.

### **Сдвиги в составе отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов ядерного матрикса клеток печени и тимуса крыс при *in vivo* воздействии цисплатина**

Хотя содержание липидов внутриядерных структур – ядерного матрикса и хроматина незначительно, они имеют важную роль в проявлении функциональной активности ядра. Изменения в составе отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов, вызванные воздействием антиопухолевого агента, могут способствовать уменьшению нарушений в метаболизме липидов ядер при опухолеобразовании, восстановлению нормального функционального статуса ядра.

Фракционирование фосфолипидов ядерного матрикса из клеток печени и тимуса крыс выявило наличие пяти фракций, представленных в различных количествах (табл.4). Воздействие цисплатина достоверно уменьшает содержание всех пяти фракций фосфолипидов в препаратах ядерного матрикса клеток печени, причем наибольшее уменьшение содержания наблюдается во фракции сфингомиелина (на 50%), в то время как уменьшение количества другого холин-содержащего фосфолипида – фосфатидилхолина не столь значительно (на 19%) (табл.4). В препаратах ядерного матрикса из клеток тимуса три из пяти фракций сокращаются в количестве, причем в отношении холинсодержащих фосфолипидов наблюдается обратная картина: заметно уменьшается содержание фосфатидилхолина, в то время как сокращение содержания сфингомиелина незначительно (табл.4). Как уже отмечалось в предыдущем разделе, изменение содержания фосфатидилхолина с одновременным изменением количества сфингомиелина, по всей вероятности, связано с перекрестным механизмом взаимопревращения: фосфатидилхолин-сфингомиелин, протекающий под воздействием цисплатина в ядре [Albi et al., 2008]. Примечательно, что подобные сдвиги, имеющие место в ядерных мембранах, обнаруживаются также в препаратах ядерного матрикса. Примечательно также то, что в клетках печени и тимуса наблюдаются разнонаправленные сдвиги относительного количества фосфатидилхолина и сфингомиелина в препаратах ядерного матрикса: если соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин заметно повышается в клетках печени, то оно уменьшается в клетках тимуса крыс. Это различие, по-видимому, связано со спецификой протекания метаболических процессов липидов в ядрах клеток печени и тимуса.

Таблица 4. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций фосфолипидов ядерного матрикса клеток печени и тимуса до и после воздействия цисплатина.

| N | Фосфолипиды           | Ядерный матрикс клеток печени крыс |                              | Ядерный матрикс клеток тимуса крыс |                              |
|---|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|   |                       | Контрольный вариант                | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант                | После воздействия цисплатина |
| 1 | Сфингомиелин          | 14,11±0,42                         | *7,00±0,20                   | 47,50±1,63                         | *43,83±1,05                  |
| 2 | Фосфатидилинозитол    | 8,06±0,24                          | *6,00±0,17                   | 31,75±1,09                         | *23,16±0,72                  |
| 3 | Фосфатидилхолин       | 14,78±0,44                         | *12,00±0,34                  | 97,50±3,34                         | *75,85±3,47                  |
| 4 | Фосфатидилэтанолламин | 18,14±0,54                         | *15,50±0,44                  | 58,25±2,00                         | 47,40±1,79                   |
| 5 | Кардиолипин           | 12,11±0,36                         | *9,50±0,27                   | 15,00±0,51                         | 14,76±0,46                   |
|   | Суммарное сод.        | 67,20±2,60                         | *50,00±1,43                  | 250,00±8,57                        | *205,00±6,38                 |

\*P < 0,05

Особого внимания заслуживает сокращение содержания сфингомиелина и фосфатидилинозитола в исследуемых препаратах ядерного матрикса (табл.4). Уменьшение содержания сфингомиелина заметно в особенности в ядерном матриксе

из клеток печени (на 50%), а фосфатидилинозитола - в препаратах ядерного матрикса, выделенных из клеток обеих тканей (на 25–27%). Учитывая то, что указанные фосфолипиды являются компонентами соответствующих циклов, играющих важную роль в функционировании сигнальных систем в ядре [Maraldi et al., 1999; Struchkov et al., 2000, Leeden et al., 2008], можно предположить возможное воздействие антиопухолевого препарата на регуляторные пути трансдукции сигналов в ядрах. Значительное сокращение содержания сфингомиелина, по-видимому, свидетельствует о возможном воздействии цисплатина на активность ферментов метаболизма сфинголипидов. Известно, что главным продуктом метаболизма сфингомиелина является церамид, который образуется с участием ядерной сфингомиелиназы. Церамид является апоптическим токсином, приводящим к гибели клетки [Alessenko et al., 2002, Leeden et al., 2008, Albi et al., 2013]. Резкое сокращение содержания сфингомиелина в препаратах печени крыс после воздействия цисплатина может быть результатом включения сфингомиелинового пути апоптоза в клетке.

Фракционирование нейтральных липидов ядерного матрикса клеток печени тимуса крыс выявило наличие шести фракций, 60–69% содержания которых составляют фракции холестерина, его эфиров и свободные жирные кислоты (табл.5). Содержание всех групп нейтральных липидов (за исключением моноглицеридов) ядерного матрикса печени крыс сокращается в разной степени после воздействия цисплатина. Так, по сравнению с контрольным вариантом, количество триглицеридов уменьшается примерно на 32% (табл.5). В препаратах ядерного матрикса печени крыс значительно сокращается количество эфиров холестерина и свободных жирных кислот (на 28,5% и 27,2% соответственно). Примерно в равной степени (21,4% и 22,3%) уменьшается содержание свободного холестерина и диглицеридов (табл.5). В препаратах ядерного матрикса тимуса крыс чувствительность к цисплатину проявляют лишь две из шести фракций нейтральных липидов - свободный холестерин и его эфиры, абсолютное содержание которых сокращается соответственно на 24,9% и 17,8% (табл.5). Абсолютное количество остальных нейтральных липидов в ядерном матриксе тимуса крыс остается неизменным после *in vivo* воздействия цисплатина.

Таким образом, результаты, представленные в данном разделе работы, свидетельствуют о разной степени чувствительности фосфолипидов, нейтральных липидов, выделяемых из препаратов ядерного матрикса клеток печени и тимуса крыс, к воздействию цисплатина, что может быть обусловлено особенностью исследуемых тканей и спецификой процессов метаболизма липидов, протекающих в этих тканях.

Таблица 5. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций нейтральных липидов ядерного матрикса клеток печени и тимуса до и после воздействия цисплатина.

| N | Нейтральные липиды | Ядерный матрикс клеток печени крыс |                              | Ядерный матрикс клеток тимуса крыс |                              |
|---|--------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|   |                    | Контрольный вариант                | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант                | После воздействия цисплатина |
| 1 | Холестерин         | 13,63±0,49                         | *10,71±0,18                  | 70,80±2,60                         | *53,20±0,91                  |
| 2 | Эфиры хол.         | 4,00±0,14                          | *2,86±0,12                   | 16,40±0,58                         | *13,48±0,26                  |
| 3 | С.Ж.К              | 11,28±0,40                         | *8,21±0,35                   | 25,26±0,89                         | 23,80±0,41                   |
| 4 | МАГ                | 4,94±0,18                          | 4,58±0,18                    | 24,32±0,75                         | 23,38±0,40                   |
| 5 | ДАГ                | 4,7±0,17                           | *3,63±0,16                   | 18,04±0,63                         | 17,64±0,30                   |
| 6 | ТАГ                | 8,45±0,30                          | *5,71±0,24                   | 9,18±0,32                          | 8,50±0,12                    |
|   | Суммарное сод.     | 47,00±1,68                         | *35,70±1,50                  | 164,00±5,77                        | *140,00±2,40                 |

\*P < 0,05

#### Сдвиги в составе отдельных фракций фосфолипидов и нейтральных липидов хроматина клеток печени и тимуса крыс при *in vivo* воздействии цисплатина

Фосфолипиды, являясь также минорными компонентами в препаратах хроматина, представлены меньшим, чем в ядерных мембранах, количеством фракций в клетках обеих тканей. Среди пяти выявленных фосфолипидных фракций содержание двух (фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина) составляет более половины общего содержания фосфолипидов (60% - в клетках печени и 53,5% - в клетках тимуса) (табл.6).

Таблица 6. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций фосфолипидов хроматина клеток печени и тимуса до и после воздействия цисплатина.

| N | Фосфолипиды          | Хроматин клеток печени крыс |                              | Хроматин клеток тимуса крыс |                              |
|---|----------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|   |                      | Контрольный вариант         | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант         | После воздействия цисплатина |
| 1 | Сфингомиелин         | 13,72±0,36                  | *7,64±0,25                   | 13,96±1,07                  | 12,37±0,61                   |
| 2 | Фосфатидилинозитол   | 13,23±0,35                  | *9,09±0,35                   | 13,60±1,04                  | *8,90±0,44                   |
| 3 | Фосфатидилхолин      | 29,40±0,78                  | 25,60±0,83                   | 39,10±2,90                  | *23,21±1,15                  |
| 4 | Фосфатидилэтаноламин | 28,91±0,77                  | *20,80±0,67                  | 25,85±1,98                  | *18,63±0,92                  |
| 5 | Кардиолипин          | 12,74±0,34                  | *9,60±0,31                   | 28,90±2,21                  | *21,60±1,07                  |
|   | Суммарное сод.       | 98,00±2,60                  | *72,73±2,35                  | 121,38±9,30                 | *84,70±4,20                  |

\*P<0.05

Воздействие цисплатина уменьшает содержание всех фракций фосфолипидов в препаратах хроматина клеток как печени, так и тимуса крыс, однако в различной степени. Так, в препаратах хроматина из клеток печени наибольшие изменения выявляются в содержании сфингомиелина (уменьшение на 44%), в то время как содержание фосфатидилхолина уменьшается на 13% (табл.6).

В препаратах хроматина из клеток тимуса наблюдается обратная картина: уменьшение содержания фосфатидилхолина на 41% и недостоверное уменьшение содержания сфингомиелина. Содержание остальных трех фракций фосфолипидов уменьшалось как в препаратах хроматина из клеток печени, так и из клеток тимуса (у фосфатидилинозитола – на 31-35%, у фосфатидилэтанолamina – на 28%, у кардиолипина – на 25%-26%) (табл.6).

Результаты свидетельствуют о схожем воздействии цисплатина на содержание и состав фосфолипидов в препаратах хроматина и ядерного матрикса клеток обеих тканей. Разнонаправленность изменений количества холинсодержащих фосфолипидов в клетках печени и тимуса наблюдается в препаратах внутриядерных структур.

Итак, в клетках печени воздействие цисплатина на перекрестный механизм взаимопревращения: фосфатидилхолин – сфингомиелин осуществляется заметным повышением соотношения фосфатидилхолин/сфингомиелин в препаратах как ядерных мембран, так и внутриядерных структур (табл.2, табл.4, табл.6). Если в препаратах ядерных мембран клеток тимуса это соотношение повышается (табл.2), то во внутриядерных структурах оно, наоборот, уменьшается (табл.4, табл.6). Этот труднообъяснимый факт, видимо, связан со спецификой метаболических процессов, протекающих внутри ядер клеток тимуса.

Таким образом, результаты, приводимые в разделах 3.2, 3.3 и 3.4 диссертационной работы, показывают уменьшение количества холинсодержащих фосфолипидов, а также фосфатидилинозитола в препаратах ядерных мембран, ядерного матрикса и хроматина клеток обеих тканей, что, по-видимому, свидетельствует о возможности воздействия цисплатина на функционирование регуляторных путей передачи сигналов на уровне ядра.

Фракционирование нейтральных липидов препаратов хроматина клеток печени и тимуса крыс выявило наличие четырех фракций. Содержание холестерина и свободных жирных кислот в обоих препаратах достигает 60-62% от общего количества нейтральных липидов (табл.7). Воздействие цисплатина достоверно уменьшает содержание всех фракций, за исключением фракции триглицеридов в препаратах хроматина из клеток печени. Уменьшение разных фракций в обоих препаратах выражено в разной степени (табл.7).

Полученные нами результаты свидетельствуют о глубоких и разнообразных трансформациях метаболизма липидов в ядре, и, в частности, в хроматине при *in vivo* воздействии противоопухолевого препарата.

Учитывая то обстоятельство, что триглицериды, холестерин и эфиры холестерина вместе с кардиолипином играют важную роль в надмолекулярной организации хроматина [Struchkov et al., 2002, Albi, 2004], можно предположить нарушение цисплатином надмолекулярной структуры хроматина в результате

количественных изменений указанных липидов в исследуемых препаратах. Учитывая также то, что показано заметное повышение содержания нейтральных липидов при злокачественной трансформации [Struchkov et al.,1993, 2000], полученные нами результаты приобретают важное значение.

Таблица 7. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций нейтральных липидов хроматина клеток печени и тимуса крыс до и после воздействия цисплатина.

| N | Нейтральные липиды | Хроматин клеток печени крыс |                              | Хроматин клеток тимуса крыс |                              |
|---|--------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|   |                    | Контрольный вариант         | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант         | После воздействия цисплатина |
| 1 | Холестерин         | 18,70±0,52                  | *12,39±0,33                  | 19,98±1,76                  | *14,42±0,74                  |
| 2 | Эфиры хол.         | 15,52±0,43                  | *10,55±0,29                  | 10,66±0,94                  | *5,78±0,30                   |
| 3 | С.Ж.К              | 19,01±0,53                  | *15,14±0,41                  | 11,94±1,06                  | *7,00±0,36                   |
| 4 | ТАГ                | 8,10±0,22                   | 7,80±0,21                    | 10,71±0,95                  | *6,80±0,35                   |
|   | Суммарное сод.     | 61,33±1,70                  | *45,88±0,23                  | 53,30 ±5,00                 | 34,00±2,00*                  |

\*P<0,05

Таким образом, принимая во внимание то, что нейтральные липиды хроматина играют важную роль в процессе организации структуры хроматина, а также стабилизируют его надмолекулярную структуру, можно предположить, что изменение их содержания способствует нарушению структуры хроматина. На основании вышеизложенного предполагается, что *in vivo* воздействие цисплатина на содержание нейтральных липидов хроматина печени и тимуса крыс носит всесторонний, комплексный характер и может способствовать повреждению надмолекулярной структуры хроматина, нарушая при этом различные функции ядра.

#### **Сдвиги в составе полифосфоинозитидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс при *in vivo* воздействии цисплатина**

Известно, что фосфоинозитидная сигнальная система обнаружена также в клеточном ядре, где были выявлены все ферменты, осуществляющие метаболизм фосфоинозитидов, синтез и распад компонентов фосфоинозитидного цикла, обеспечивающего функционирование сигнальной системы [Leeden et al., 2004, Barlow et al., 2010, Shah et al., 2013]. Уровень ядерных фосфоинозитидов может меняться в ответ на различные стимулы, что свидетельствует о способности этих липидов регулировать специфические функции ядра. Уровень полифосфоинозитидов может меняться также в ответ на воздействие различных противоопухолевых средств, разных медикаментов, применяемых при лечении раковых заболеваний. Такие исследования могут дать ценную информацию для организации лечения.

В заключительной части диссертационной работы приводятся результаты экспериментов, посвященных изучению содержания полифосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс до и после *in vivo* воздействия цисплатина.

Из препаратов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс методом микротонкослойной хроматографии были выделены монофосфоинозитиды, дифосфоинозитиды и трифосфоинозитиды согласно процедуре, описанной в методической части работы. Эксперименты показали, что более 40% общего содержания фосфоинозитидов представлено монофосфоинозитидами, в то время как относительное процентное содержание дифосфоинозитидов и трифосфоинозитидов составляет 32-33% и 26-27%, соответственно. Воздействие цисплатина приводит к заметному снижению относительного количества и процентного содержания монофосфоинозитидов в обоих препаратах ядерных мембран.

Итак, эти результаты показывают, что на фоне заметного снижения общего количества фосфолипидов (в том числе фосфатидилинозитола) ядерных мембран под воздействием противоопухолевого препарата (табл.1) наблюдается достоверное повышение количества дифосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса и повышение количества трифосфоинозитидов в особенности в препаратах ядерных мембран клеток тимуса крыс (табл.8).

Таблица 8. Содержание (в микрограммах на 1 г ткани) отдельных фракций фосфоинозитидов (моно-, ди- и трифосфоинозитидов) ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс до и после воздействия цисплатина.

| N | Фосфолипиды                              | Ядерные мембраны клеток печени крыс |                              | Ядерные мембраны клеток тимуса крыс |                              |
|---|--|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
|   |  | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина | Контрольный вариант                 | После воздействия цисплатина |
| 1 | Монофосфоинозитиды                       | 134,9±4,46                          | *95,5±3,08                   | 100,9±2,54                          | *90,2±1,60                   |
| 2 | Дифосфоинозитиды                         | 102,8±4,15                          | *127,3±3,07                  | 81,6±1,52                           | *114,5±2,76                  |
| 3 | Трифосфоинозитиды                        | 85,6±2,56                           | *95,5±2,75                   | 65,5±1,42                           | *142,2±0,95                  |
|   | Трифосфоинозитиды/<br>Монофосфоинозитиды | 0,64                                | 1,00                         | 0,65                                | 1,58                         |

\*P < 0,05

Фактически, цисплатин при *in vivo* воздействии стимулирует превращение монофосфоинозитидов в дифосфоинозитид и далее в трифосфоинозитид. Хорошо известно, что эти превращения контролируются активностью определенных фосфоинозитидкиназ. Активность этих киназ может быть связана с деструкцией определенных ядерных структур, вызванной воздействием цисплатина. Известно, что соотношение трифосфоинозитид/монофосфоинозитид показывает статус ядерных мембран относительно функционирования ряда ядерных сигнальных систем. Полученные нами результаты свидетельствуют о заметном повышении данного соотношения (табл.8), что может отразиться на функционировании

регуляторных систем - путей передачи сигналов через ядерную мембрану. Эти результаты представляются интересными с учетом имеющихся в литературе данных о том, что индуцированными цисплатином повреждения в структуре ДНК активируют функционирование фосфатидилинозитол 3-киназа/Akt каскада, который способствует выживанию клеток [Hayakawa et al., 2000, Ohta et al., 2006]. Хорошо известно, что индуцированные цисплатином повреждения ДНК активируют разные сигнальные системы, что либо предотвращает, либо способствует гибели клеток [Florea, Bussrlberg, 2011]. Следовательно, цисплатин, являясь одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов, часто демонстрирует противоречивые эффекты, предотвращая гибель клеток. Несмотря на то, что обширные повреждения ДНК могут индуцировать клеточную смерть посредством апоптоза, определенные сигнальные системы, включая фосфатидилинозитол 3-киназа/Akt каскад и другие, могут регулировать индуцированный цисплатином апоптоз. Учитывая, что сигнальные пути регулируют чувствительность цисплатина можно считать, что одним из способов повышения эффективности цисплатина является его применение совместно с агентами, воздействующими на сигнальные пути и способствующими резистентности препарата [Florea, Bussrlberg, 2011]. Например, в литературе хорошо известно, что подавление функционирования фосфатидилинозитол 3-киназа/Akt каскада ингибитором фосфатидилинозитол 3-киназы вортманином повышает эффективность воздействия цисплатина [Ohta et al., 2006]. Эти исследования важны в практической медицине, так как показывают превосходство комбинированной терапии цисплатина с вортманином, повышающей терапевтическую эффективность противоопухолевого препарата [Ohta et al., 2006]. Повышение соотношения трифосфоинозитид/монофосфоинозитид под воздействием цисплатина может несколько повысить активность фосфатидилинозитол 3-киназы, что будет способствовать выживанию клеток. Видимо поэтому совместное с цисплатином применение ингибитора вортманина повышает терапевтическую эффективность препарата. Повышение этого соотношения наблюдается как в препаратах ядерных мембран печени, так и тимуса (табл.8). Примечательно, что это соотношение в контроле одинаково в препаратах ядерных мембран обеих тканей (0,64 – 0,65), однако после воздействия цисплатина повышение соотношения более выражено в ядерных мембранах клеток тимуса крыс (1,58 против 1,00 в ядерных мембранах клеток печени) (табл.8). Последнее свидетельствует о том, что процесс превращения фосфоинозитидов более эффективен в ядерных мембранах клеток тимуса, что может быть связано с разницей метаболизма тканей печени и тимуса.

Таким образом, приведенные в заключительной части диссертации результаты приводят к следующему основному выводу. Введение цисплатина *in vivo* достоверно уменьшает количество монофосфоинозитидов с одновременным повышением количества дифосфоинозитидов и трифосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс. Это повышение соотношения трифосфоинозитид/монофосфоинозитид указывает на воздействие цисплатина на функционирование фосфоинозитидного регуляторного пути в ядрах клеток печени и тимуса крыс.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлено достоверное уменьшение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов в ядрах клеток печени и тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина, что указывает на заметное подавление метаболизма липидов ядер антиопухолевым препаратом. Снижение общего содержания фосфолипидов и нейтральных липидов ядер наблюдается как в препаратах ядерной мембраны, где сосредоточена большая часть липидов ядер, так и в препаратах внутриядерных структур: ядерного матрикса и хроматина, причем примерно в равном процентном соотношении.
2. Цисплатин достоверно уменьшает количество почти всех фракций фосфолипидов ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс, причем наибольшее уменьшение наблюдается в количестве сфингомиелина на фоне незначительных изменений количества фосфатидилхолина. Эти результаты указывают на воздействие цисплатина на перекрестный механизм взаимопревращения: фосфатидилхолин - сфингомиелин.
3. В клетках печени и тимуса наблюдаются разнонаправленные сдвиги относительного количества фосфатидилхолина и сфингомиелина в препаратах внутриядерных структур. Если соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин в препаратах ядерного матрикса и хроматина заметно повышается в клетках печени, то оно резко уменьшается в клетках тимуса крыс.
4. Цисплатин приводит к однонаправленным количественным сдвигам во фракциях нейтральных липидов ядерных мембран и внутриядерных структур клеток обеих тканей. Уменьшение количества наблюдается почти во всех выявленных фракциях, что свидетельствует об универсальном характере воздействия противоопухолевого препарата на процессы метаболизма липидов в ядрах.
5. Введение цисплатина приводит к снижению количества монофосфоинозитидов и повышению содержания трифосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток печени и тимуса крыс. Повышение соотношения трифосфоинозитид/монофосфоинозитид указывает на воздействие цисплатина на функционирование фосфоинозитидного регуляторного пути в ядрах клеток печени и тимуса крыс.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р., Хачатрян Г.Н., Явроян Ж.В., Геворкян Э.С. “Сдвиги в составе фосфолипидов ядер клеток печени крыс после *in vivo* воздействия цисплатина”, //12-ая Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века”, Пушкино, 2008, стр.182.

2. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р., Явроян Ж.В., Хачатрян Г.Н., Геворкян Э.С. “Действие цисплатина на содержание нейтральных липидов ядер клеток печени и головного мозга крыс”, //13-ая Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века”, Пушкино, 2009, стр.76-77.
3. Nakobyan N.R., **Hovhannisyan A.G.**, Yavroyan Zh.V., Gevorgyan E.S. “Effect of cisplatin on rat brain and liver cells nuclear phospholipids” // International Conference and DAAD Alumni Seminar “Biotechnology and Health-3”, Yerevan, 2009, pp.115-116.
4. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р. “Сдвиги в составе нейтральных липидов ядер клеток печени и головного мозга крыс после *in vivo* воздействия цисплатина” // Международная студенческая биологическая конференция, Ереван, 2009, стр. 8.
5. Nakobyan N.R., Yavroyan Zh.V., **Hovhannisyan A.G.**, Gevorgyan E.S. “Cisplatin action on content of neutral lipids of rat liver and brain nuclei” //”Journal of Biomolecular Structure and Dynamics”, Albany, 2009, 26, 6, p.877.
6. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Nakobyan N.R., **Hovhannisyan A.G.** “Cisplatin action on phospholipid composition in nuclear fraction of rat liver cells” // “Biolog. Journal of Armenia”, 2009, 4, 61, pp.20-24.
7. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р., Явроян Ж.В., Хачатрян Г.Н., Геворкян Э.С. “Взаимосвязанные изменения количества холинсодержащих фосфолипидов в ядрах клеток различных тканей крыс при воздействии цисплатина”, //14-ая Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века”, Пушкино, 2010, стр.165-166.
8. Nakobyan N.R., Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., **Hovhannisyan A.G.**, “Effect of cisplatin on content of rat liver cells nuclear phospholipids” // Abstracts of ISCO Congress, International Society for Cellular Oncology”, Dresden, 2010, P119-B.
9. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р., Хачатрян Г.Н., Явроян Ж.В., Геворкян Э.С. “Сдвиги в составе нейтральных липидов хроматина при *in vivo* воздействии цисплатина”, //15-ая Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века”, Пушкино, 2011, стр.95.
10. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Nakobyan N.R., **Hovhannisyan A.G.**, Khachatryan G.N. “ Effect of cisplatin on content of phospholipids in rat liver chromatin fraction” // 8<sup>th</sup> EBSA European Biophysics Congress, Budapest, 2011, P-153.
11. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., **Hovhannisyan A.G.**, Nakobyan N.R. “*In vivo* action of cisplatin on phospholipid content in rat liver and thymus chromatin” // “Electronic Journal of Natural Sciences”, 2012, 2, 19, pp.3-6.
12. **Оганесян А.Г.**, Акопян Н.Р., Явроян Ж.В., Геворкян Э.С. “Действие цисплатина на фосфолипидный состав фракции хроматина клеток тимуса крыс” //16-ая Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века”, Пушкино, 2012, стр.189-190.
13. Gevorgyan E.S., **Hovhannisyan A.G.**, Yavroyan Zh.V., Nakobyan N.R. “Content of neutral lipids in rat liver and thymus chromatin under the *in vivo* action of cisplatin” //“Biolog. Journal of Armenia”, 2012, 3, 64, pp.97-101.

14. Hakobyan N.R., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Gevorgyan E.S. “Cisplatin effects on nuclear lipids of rat thymus cells” // The EMBO meeting, Amsterdam, 2013, C 190.
15. Gevorgyan E.S., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Sargisyan E.G. “Cisplatin *in vivo* action on content of neutral lipids in rat liver and thymus nuclear membranes” // “Biolog. Journal of Armenia”, 2013, 2, 65, pp.99-103.
16. Gevorgyan E.S., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Sargisyan E.G. “Cisplatin action on phospholipid content in rat liver and thymus nuclear membranes” // “Electronic Journal of Natural Sciences”, 2013, 2, 21, pp. 14-16.
17. Gevorgyan E.S., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Ghukasyan G.B. “In vivo action of cisplatin on content of neutral lipids in rat liver and thymus nuclear matrix” // “Biolog. Journal of Armenia”, 2013, 3, 65, pp.85-88.
18. Оганесян А.Г. “Сдвиги в содержании фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс после воздействия цисплатина” // «Биолог.журн. Армении», 2013, 3, 65, стр.42-45.
19. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N.R., Sargsyan E.G. “Phospholipid content in rat liver and thymus nuclear matrix under the *in vivo* action of cisplatin” // “Electronic Journal of Natural Sciences”, 2014, 1, 22, pp. 8-11.
20. Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhannisyan A.G., Hakobyan N.R. “Changes in polyphosphoinositides content in rat liver and thymus cells under the action of cisplatin” // “Biolog. Journal of Armenia”, 2014, 2, 66, pp.46-51.
21. Hakobyan N.R., Hovhannisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Gevorgyan E.S. “Phosphatidylcholin/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus chromatin after the cisplatin *in vivo* action” // “E.book of FEBS Congress 2014, The FEBS Journal”, 2014, P.494.

## Հովհաննիսյան Ազալի Գևորգի

Առնետի յարդի և ուրցագեղձի բջիջների կորիզային կառուցվածքներում լիպիդների բաղադրության փոփոխությունները *in vivo* ազդեցության ժամանակ

### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

*Հանգուցային բառեր՝* ցիսպլատին, կորիզաթաղանթ, կորիզային մատրիկս, քրոմատին, լիպիդներ:

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է առնետների երկու հյուսվածքի՝ յարդի և ուրցագեղձի բջիջների կորիզներում, կորիզային թաղանթներում և ներկորիզային կառուցվածքներում՝ կորիզային մատրիքում և քրոմատինում, լիպիդների քանակական և որակական փոփոխությունների մանրակրկիտ ուսումնասիրմանը հակառուցքային հայտնի միացության՝ ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության ժամանակ:

Ցույց է տրված ֆոսֆոլիպիդների և չեզոք լիպիդների ընդհանուր քանակության հավաստի նվազում ցիսպլատինի ազդեցության ժամանակ, ինչը վկայում է նշված հյուսվածքների բջջակորիզներում լիպիդների նյութափոխանակային գործընթացների վրա այդ հակառուցքային միացության հարուցած զգալի ճնշման մասին: Հատկանշական է, որ լիպիդների ընդհանուր քանակության նվազում դիտվում է ինչպես կորիզային թաղանթների, այնպես էլ ներկորիզային կառուցվածքների պատրաստուկներում, ընդ որում գրեթե նույն տոկոսային հարաբերությամբ:

Աշխատանքում ցույց են տրված նաև ցիսպլատինի ազդեցության տակ ֆոսֆոլիպիդների առանձին ֆրակցիաների բաղադրության փոփոխությունները երկու հյուսվածքների բջիջների կորիզային թաղանթների պատրաստուկներում: Ընդ որում, բոլորից շատ նվազում է սֆինգոմիելինի բաղադրությունը, այն դեպքում, երբ ֆոսֆատիդիլխոլինի բաղադրության փոփոխությունները չնչին են: Ստացված այս տվյալները վկայում են կորիզներում ընթացող (և շատ հեղինակների կողմից հաստատված) ֆոսֆատիդիլխոլին – սֆինգոմիելին փոխադարձ խաչաձև վերափոխման մեխանիզմի վրա ցիսպլատինի ազդեցության մասին: Ստացվում է, որ ցիսպլատինը զգալիորեն խթանում է սֆինգոմիելինի մուլեկուլից ֆոսֆատիդիլխոլինի մուլեկուլի վրա ֆոսֆոխոլինային խմբի տեղափոխումն իրականացնող մեխանիզմի ընթացքը: Նկատի ունենալով այն, որ ֆոսֆատիդիլխոլինի և սֆինգոմիելինի սինթեզը պայմանավորող մետաբոլիկ ուղիները համակցված են և համաձայնեցված են իրականում, կարելի է ենթադրել, որ վերը նշված մեխանիզմի փոփոխությունը կազդի ներկորիզային ազդանշանային մուլեկուլների (ցերամիդի, դիացիլգլիցերիդի) բաղադրության վրա: Աշխատանքում ցույց է տրված նաև չեզոք լիպիդների գրեթե բոլոր ֆրակցիաների բաղադրության հավաստի նվազում ցիսպլատինի ազդեցության ժամանակ ինչպես յարդի, այնպես էլ ուրցագեղձի բջիջների կորիզաթաղանթների պատրաստուկներում:

Յիսապլատինի *in vivo* ազդեցության տակ յարդի և ուրցագեղձի բջիջների ներկորիզային կառուցվածքների՝ կորիզային մատրիքսի և քրոմատինի ֆոսֆոլիպիդների բաղադրության փոփոխություններից առավել հատկանշական են (ինչպես և կորիզային թաղանթների պատրաստուկներում) խոլին-պարունակող ֆոսֆոլիպիդների քանակության տեղաշարժերը: Առաջին անգամ ցույց է տրված, որ յարդի և ուրցագեղձի բջիջներում ֆոսֆատիդիլխոլինի և սֆինգոմիելինի փոփոխությունները տարբեր ուղղվածություն ունեն: Այսպես, եթե յարդի բջիջների կորիզային մատրիքսի և քրոմատինի պատրաստուկներում դիտվում է ֆոսֆոտիդիլխոլին/սֆինգոմիելին քանակական հարաբերության հավաստի աճ, ապա ուրցագեղձի նույն ներկորիզային կառուցվածքներում այդ հարաբերությունը զգալիորեն փոքրանում է: Հատկանշական է նաև այն, որ ցիսապլատինի ազդեցությամբ պայմանավորված չեզոք լիպիդների բաղադրության փոփոխությունները կորիզային մատրիքսի և յարդի բջիջներում ունեն միևնույն ուղղվածությունը՝ նվազում են գրեթե միևնույն տոկոսային հարաբերությամբ:

Կորիզներում ֆոսֆոհինոզիտիդային կարգավորիչ ուղու գործունեության վրա ցիսապլատինի հնարավոր ազդեցության պարզաբանման նպատակով աշխատանքում ուսումնասիրվել են յարդի և ուրցագեղձի կորիզաթաղանթների պատրաստուկներում պոլիֆոսֆոհինոզիտիդների բաղադրության փոփոխությունները: Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ հակաուռուցքային միացությունը բերում է մոնոֆոսֆոհինոզիտիդների բաղադրության փոքրացման և տրիֆոսֆոհինոզիտիդների քանակության աճի, ընդ որում տրիֆոսֆոհինոզիտիդ/մոնոֆոսֆոհինոզիտիդ հարաբերության աճն առավել զգալի է ուրցագեղձի բջիջների կորզաթաղանթներում:

Այսպիսով, ատենախոսական աշխատանքում ստացված են ամբողջ շարք կարևոր տեսական արդյունքներ, որոնք վկայում են, որ առնետների յարդի և ուրցագեղձի բջիջների կորիզներում, կորիզային թաղանթներում և ներկորիզային կառույցներում ցիսապլատինի *in vivo* ազդեցությունը բերում է լիպիդային մետաբոլիզմի զգալի ճնշման, ընդ որում դրսևորվում են ինչպես ունիվերսալ, այնպես էլ սպեցիֆիկ փոփոխություններ: Մասնավորապես, ցույց է տրված, որ հակաուռուցքային միացությունը երկու հյուսվածքներում էլ կարող է բերել բջջակորիզներում լիպիդ-կախյալ կարգավորիչ մեխանիզմների, մասնավորապես ֆոսֆոհինոզիտիդային ազդանշանային ուղու, գործունեության փոփոխությունների: Ստացված արդյունքներն ունեն նաև կարևոր գործնական նշանակություն, քանի որ կարող են նպաստել քիմիաթերապիայի ժամանակ ցիսապլատինի ոչ ցանկալի, կողմնակի ներգործություններից խուսափելու և դեղամիջոցի ազդեցության արդյունավետությունը մեծացնելու համար:

**Changes in the lipid composition of the nuclear structures of liver and thymus cells of rats under in vivo effects of cisplatin**

**ABSTRACT**

**Keywords:** cisplatin, nuclear membrane, nuclear matrix, chromatin, lipids.

The thesis is devoted to the research on qualitative and quantitative changes in lipids of the nucleus, nuclear membrane, as well as within the nuclear structures: matrix and nuclear chromatin, in the cells of the liver and thymus of rats under in vivo effects of cisplatin. The reliable reduction of total phospholipids and neutral lipids was shown upon the effect of cisplatin, indicating to inhibition of lipid metabolism by the antitumor drug. The decrease in the content of individual fractions of phospholipids was also shown in both preparations of the nuclear membrane under the influence of cisplatin. The content of sphingomyelin was mostly reduced, while the content of phosphatidylcholine changed insignificantly. The research findings signify the effects of cisplatin on the mechanisms of cross-phosphatidylcholine sphingomyelin interconversion process running in the nucleus. Hence, it turned out that cisplatin stimulated the phosphocholine transport mechanism: from sphingomyelin molecule towards molecule of phosphatidylcholine. Given the fact that the metabolic pathways of phosphatidylcholine and sphingomyelin synthesis are combined and implemented in accord with each other, we can assume that changes occurring in the above-mentioned mechanism will have an impact on the content of intranuclear signaling molecules (ceramide, diacylglycerol). The work also showed a significant decline in virtually all individual fractions of neutral lipids in both preparations of the nuclear membrane when exposed to cisplatin.

The most significant changes in phospholipid content were observed under the in vivo effects of cisplatin in intranuclear structures (nuclear matrix, chromatin) of the liver and thymus cells. For the first time, it was shown that the changes of phosphatidylcholine and sphingomyelin in cell preparations of liver and thymus of rats were versatile in orientation. Thus, in preparations of nuclear matrix and chromatin of liver cells a significant increase of phosphatidylcholine / sphingomyelin quantitative ratio was observed, whereas in preparations of thymic cells the ratio considerably decreased. It is also worthy to mention that under exposure to cisplatin the content of neutral lipids in the preparations of the nuclear matrix of both tissues decreased actually in the same percentage.

To investigate the effects of cisplatin on phosphoinositide regulatory pathways within this research work, the changes in the content of polyphosphoinositides were studied in preparations of the nuclear membrane of cells obtained from the liver and thymus of rats. It was firstly shown that the antitumor drug decreased the amount and quantity monophosphoinositides and increased the quantity of triphosphoinositides, wherein the changes in ratio of triphosphoinositides / monophosphoinositides most significantly in the nuclear membrane preparations of cells of the thymus.

A number of theoretical results were obtained in the thesis to show that in nuclei, nuclear membranes, as well as in intranuclear structures of liver and thymus cells of rats under in vivo effects of cisplatin the significant inhibition of lipid metabolism was observed; furthermore, both universal and specific changes were manifested. It was shown that an antitumor drug in both tissues can lead to changes in the activity of lipid-dependent regulatory mechanisms occurring in the nucleus, in particular changes in activity of phosphoinositide signaling pathways. Data obtained are also of great practical importance, as they can contribute to reducing unwanted side effects of cisplatin during chemotherapy, as well as enhance the efficiency of the drug fumes.