

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИПИДЫ МЕМБРАН НОРМАЛЬНЫХ И ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ

А.Ю.Тадевосян, Т.Б.Батикян, Л.Ю.Асатрян, А.Л.Гарибян,
М.Г.Мелик-Андреасян, Э.С.Геворгян, Ю.В.Тадевосян

*/Институт молекулярной биологии НАН РА, Республиканский
гематологический центр МЗ РА, Ереванский государственный университет/
375014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: лимфоциты, хронический лимфолейкоз, мембраны, липидные модификации, фосфолипиды, нейтральные липиды, арахидоновая кислота

Ранее нами было показано [1–3] существование тесной взаимосвязи между функционированием фосфоинозитидного (ФИ) цикла и различных липид-модифицирующих систем в плазматических мембранах (ПМ) различных клеточных популяций. Эти, а также имеющиеся немногочисленные литературные данные [20] позволили предположить наличие в клеточных мембранах кооперативного липопротеинового домена ФИ сигнального механизма, включающего как идентифицированные до сих пор белковые молекулы каскада передачи внешних сигналов (рецепторы, G-белки, ФИ-фосфодиэстераза, киназы, фосфатазы и др.), так и их специфические липидные микроокружения с комплексом ферментных систем липидной модификации.

В состоянии относительного покоя клеток как различные липопротеиновые домены (сигнальные, транспортные и пр.), так и мембрана в целом характеризуются установленным в них относительно стабильным и строго специфическим динамическим равновесием качественно-количественных, структурных, физико-химических, обменных и прочих морфофункциональных параметров. Совокупность последних сформулирована нами как “метаболический статус покоя” мембранных структур.

Кратковременное действие на покоящиеся клетки любого внешнего сигнала модулируется через быстрые и обратимые кооперативные процессы модификации липопротеинового бислоя мембран. Механизм модификационных процессов в липидном бислое осуществляется ферментными системами деацилирования-реацилирования, декарбоксилирования, трансметиляции и диэстеразного расщепления различных

фракций мембранных липидов. В быстрые модификационные процессы в основном вовлекается внутримембранный потенциал кооперативных механизмов регуляции метаболического статуса ПМ клеток. Согласно результатам ранее проведенных нами исследований [1–3], а также имеющимся относительно немногочисленным и порой противоречивым литературным данным [5,8,10,19,21], подобные обратимые сдвиги могут быть зарегистрированы уже с первых секунд трансдукции внешних сигналов.

При длительном же воздействии на клетку разнообразных внешних сигналов или на поздних этапах трансдукции информации агонистов в общий процесс изменения мембранных характеристик может быть вовлечен весь потенциал регуляторных механизмов клетки с активацией генома, внутриклеточных мембранных структур, транспортных систем и т.д. При этом в ПМ клеток устанавливается новый хронически измененный метаболический статус покоя.

По сей день остаются нерешенными многочисленные вопросы, связанные с молекулярно-биологическими и биохимическими механизмами этиологии, патогенеза и терапии злокачественных новообразований, в частности в системе крови. Среди имеющихся гипотез этиологии злокачественных новообразований, на наш взгляд, особого внимания заслуживает гипотеза “мембранной аутогибридизации”, принципиально меняющая понимание этиопатогенеза заболевания, предполагая исходную неполноценность ПМ клеток как первопричины опухолевого роста.

При развитии болезни поражаются такие жизненно важные функции клеток, как механизмы генетического контроля над пролиферацией и дифференциацией клеток, межклеточные контакты, многочисленные трансмембранные процессы, защитные (иммунные) реакции и т.д. Согласно современным представлениям, одним из важных морфофункциональных составляющих клетки, вовлекаемых в нормальное осуществление этих клеточных функций, является ПМ.

Вышеизложенное, а также общая теория “мембранной мишени” в этиологии различных заболеваний оправдывают пристальное внимание, уделяемое учеными изучению роли ПМ в этиологии раковых новообразований. В настоящее время наиболее широкомасштабными и многоплановыми являются исследования патологических отклонений в функционировании белковых молекул — компонентов клеточной мембраны при раковых заболеваниях. Однако относительно малочисленны целенаправленные и масштабные исследования по изучению механизмов кооперативного вовлечения в этиопатогенез малигнизации клеток, помимо белков, также мембранных липидов, низкомолекулярная ферментная система обмена которых локализована в основном в обращенном к цитоплазме липидном монослое или же “замаскирована” в толще клеточной мембраны.

В настоящей работе приведены результаты исследований, направленных на сравнительное изучение процессов кратковременной (5 сек) или относительно длительной (60 мин) модификации [^{14}C]арахидоновой ки-

слотой (АК) жирнокислотного состава различных фракций фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) мембран лимфоцитов крови здоровых доноров и больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) в состоянии относительного покоя клеток.

Материал и методы

Лимфоциты получали из цельной крови здоровых доноров и больных ХЛЛ. Клетки выделяли по стандартной методике Innes [15] в градиенте свежеприготовленного раствора фиколл-верографина (1 часть 32,8% верографина и 2,4 части 8% водного раствора фиколла-400, $d=1,076-1,077$). При чрезмерном загрязнении лимфоцитов эритроцитами последние лизировали гипотоническим шоком. Для этого на осадок клеток наливали 2,7 мл дистиллированной воды, встряхивали и через 10 сек добавляли 0,3 мл 10-кратного физиологического раствора. Лимфоциты осаждали и суспендировали (10^5-10^6 клеток/мл) в минимальной основной среде Игла (pH=7,4).

Для включения свободной меченой АК в липиды мембран лимфоцитов к 0,2 мл инкубационной среды добавляли по 0,3 мл клеточной суспензии, содержащей 0,2 мкКи/мл [14 C]АК (уд. акт. 58 мКи/ммоль, "Amersham", Великобритания), $MgCl_2$ — 50, АТФ — 12,5, СоА — 1, ДТТ — 1 ммоль. Инкубацию проводили в качающейся водяной бане при 37 °С. На 5 сек или 60 мин инкубации реакцию останавливали добавлением 2 мл холодной смеси хлороформ-метанола (1:2).

Липиды экстрагировали методом Bligh, Dyer [7]. ФЛ и НЛ фракционировали методом одномерной тонкослойной хроматографии [3]. Радиоактивность проявленных в парах иода и идентифицированных соответствующими стандартами ("Sigma", США) липидных фракций определяли на радиосканере "Berthold" (Германия) и рассчитывали в сцинтилляционной жидкости Bray [9] на сцинтилляционном спектрометре Roche-Bioelectronique Kontron, SL-4221 (Франция).

Каждое опытное условие было воспроизведено в 5–8 различных экспериментах по 5 параллелей. Статистический анализ проводили по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

По своей функциональной значимости в жизнедеятельности клеток особое место занимает метаболизм АК. В норме и при различных формах лейкемии установлено вовлечение ее в сигнальную трансдукцию через ФИ-цикл как вторичного посредника [11,23,], в процессы синтеза биологически активных эйкозаноидов [13], в функционирование СФМ-цикла как медиатора [16,22] и т.д. Исходя из этого, было проведено детальное исследование закономерностей быстрого (5 сек) включения и более длительного (60 мин) перераспределения АК в ФЛ и НЛ мембран лимфоцитов в норме и при ХЛЛ.

Исследование особенностей включения [^{14}C]АК в ФЛ нормальных лимфоцитов в течение 5 сек инкубации показало преимущественное (около 70% от суммы включенной в ФЛ радиоактивности) накопление ее во фракции кардиолипинов (КЛ). В условиях ХЛЛ на фоне достоверного уменьшения в мембранах содержания данного ФЛ наблюдалось некоторое повышение относительного уровня всех остальных АК-содержащих ФЛ фракций. Обнаруженный нами факт специфичности фракции КЛ как акцептора АК в быстрых процессах эстерификации липидов дополняет литературные данные последних лет об активном вовлечении данного ФЛ в мембранные процессы действия цитотоксинов [12], инфицирования человеческих Т-клеток вирусом лейкемии типа I [24], развития апоптоза в эритролейкемических K562 клетках [17] и пр. (рис. 1).

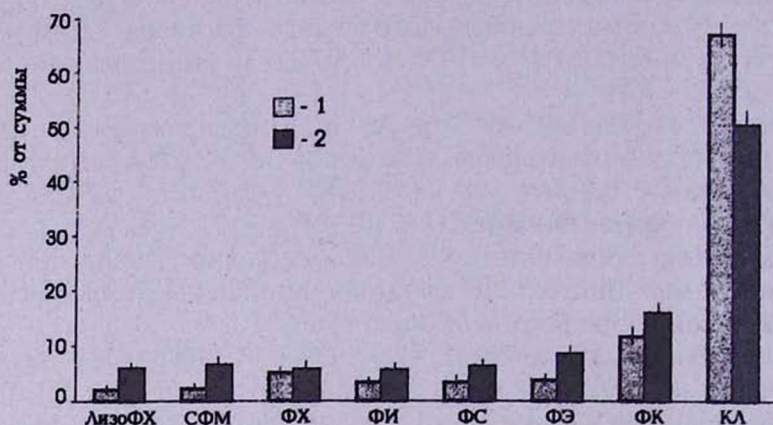


Рис. 1. Включение [^{14}C]арахидоновой кислоты в фосфолипиды мембран лимфоцитов здоровых доноров (1) и больных хроническом лимфолейкозом (2) в течение 5 сек. Здесь и на рисунках 2–4 данные представлены в процентах от суммы радиоактивности (100 %), включенной в липиды мембран

Изучение процессов включения и перераспределения [^{14}C]АК в мембранные ФЛ в течение 60 мин инкубации в соответствии с ранее полученными нами данными [4] показало (рис.2) преимущественное накопление метки во фракции фосфатидилхолинов (ФХ), количественно преобладающего во внешнем монослое клеточных мембран ФЛ как в норме, так и при ХЛЛ. Если повышенный уровень (на 20% по сравнению с нормой) включения АК во фракцию ФХ на фоне значительного понижения арахидонил-лизоФХ в состоянии относительного покоя лимфоцитов при ХЛЛ указывает на превалирование реакций синтеза данного ФЛ над его деацилированием, то резкое понижение уровня метки во фракции КЛ свидетельствует о диаметрально противоположном. Примечательно, что факт подавления процесса включения АК во фракцию КЛ при ХЛЛ обнаруживается в условиях как 5 сек, так и 60 мин ин-

кубации. Сдвиги же, обнаруженные в содержании фракций ФИ, фосфатидилсеринов (ФС) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) при 60 мин инкубации, по всей вероятности, указывают на возможное развитие при данной патологии дефектов в пролонгированных модификационных механизмах (реакции фосфодиэстеразного или деацилазного расщепления ФИ, декарбоксилирования ФС и трансметилирования ФЭ), осуществляющих дискутируемые в литературе [14,18] процессы фракционных взаимопревращений отмеченных ФЛ.

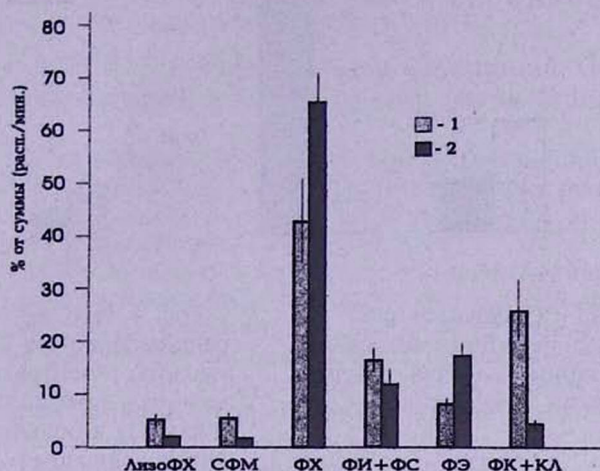


Рис. 2. Процентное распределение радиоактивности [^{14}C]арахионовой кислоты в фосфолипидах мембран лимфоцитов здоровых доноров (1) и больных хроническим лимфолейкозом (2) в течение 60 мин инкубации

В следующей серии экспериментов были изучены закономерности включения [^{14}C]АК в НЛ клеточных мембран лимфоцитов в норме и при ХЛЛ (рис.3.). Если в норме обнаруживалось быстрое (в течение 5 сек) включение АК во фракции моноацилглицеринов, 1,2-диацилглицеринов и триацилглицеринов мембран лимфоцитов на 75, 20 и 5% соответственно, то в условиях ХЛЛ наибольшее накопление АК наблюдалось уже во фракции триацилглицеринов и составляло около 60% от суммы включенной радиоактивности. Во фракциях же моноацилглицеринов и 1,2-диацилглицеринов накопление метки составило 25 и 15% соответственно. Следовательно, в отличие от нормы при ХЛЛ обнаруживаются существенные нарушения метаболических путей быстрого ацилирования НЛ мембран лимфоцитов с начальным избирательным накоплением АК во фракции триацилглицеринов, выступающей в роли "временного депо" для нее [6].

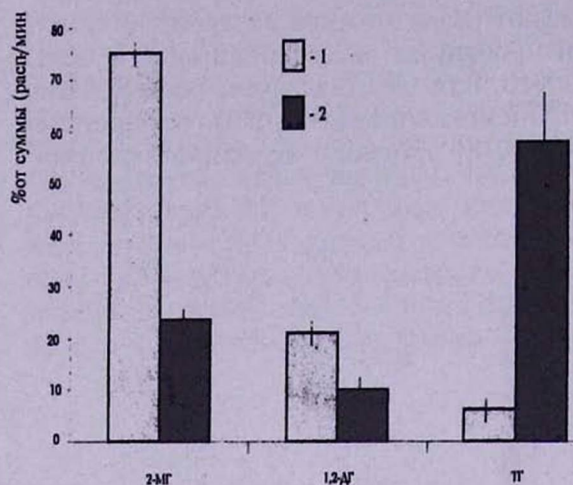


Рис. 3. Включение [^{14}C]арахидоновой кислоты в отдельные фракции нейтральных липидов лимфоцитарных мембран в норме (1) и при хроническом лимфолейкозе (2) в течение 5 сек

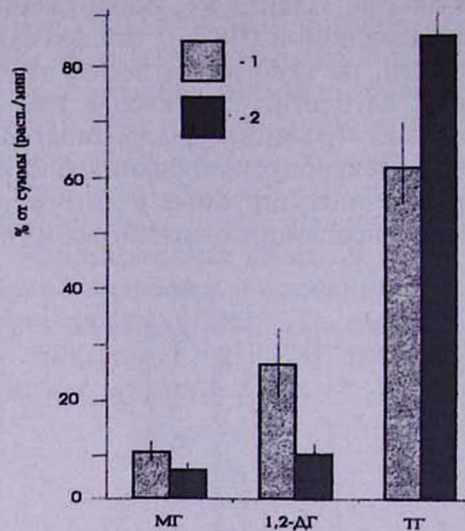


Рис. 4. Процентное распределение радиоактивности [^{14}C]арахидоновой кислоты в нейтральных липидах мембран лимфоцитов здоровых доноров (1) и больных хроническим лимфолейкозом (2) в течение 60 мин инкубации

Проведение исследований в условиях 60 мин инкубации (рис.4.) показало преимущественное накопление [^{14}C]АК во фракции триацилглицеринов как в норме (около 60%), так и при ХЛЛ (более 80%). Если при патологии по сравнению с нормой сохраняется закономерность понижения уровня радиоактивности моноацилглицеринов и 1,2-диацилглицеринов, то уровень АК в триацилглицеринах на 20% превышает таковой в норме. Обнаруженные существенные различия от нормы уровня включения и распределения [^{14}C]АК в отдельные фракции ФЛ и НЛ при ХЛЛ после 60 мин инкубации указывают на становление в липопротеиновом бислое ПМ патологически трансформированных клеток нового измененного метаболического статуса покоя.

Суммируя вышеприведенные экспериментальные данные, можно заключить, что в условиях ХЛЛ как при быстрых, так и относительно медленных "ответах" лимфоцитов на рецептор-неопосредуемый внешний сигнал ([^{14}C]АК) выявляются специфические нарушения в процессах модификации жирнокислотного состава отдельных фракций липидного компонента ПМ. Примечательно, что отмеченные нарушения, выявляемые при патологии, более достоверны в экспериментальных условиях 5 сек инкубации клеток, подтверждая наше предположение о мембранассоциированном характере патологических дефектов в липид-модифицирующих системах ПМ лимфоцитов при ХЛЛ.

Проблема идентификации и характеристики дефектных звеньев липид-модифицирующих ферментных систем мембран лимфоцитов при исследуемой форме лейкемии находится на стадии интенсивного исследования.

Поступила 28.03.99

**ՆՈՐՄԱԼ ԵՒ ԼԵՅԿՈԶԱՅԻՆ ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ ԹՎԱՆԹԱՅԻՆ
ԼԻՊԻԴՆԵՐՈՒՄ ԱՐԱՔԻԴՈՆԱԹԹՎԻ ՆԵՐՄՈՒԾՄԱՆ
ՕՐԻՆԱԶՄՓՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Ա.Յու. Թադևոսյան, Թ.Բ. Բատիկյան, Լ.Յու. Ասատրյան, Ա.Լ. Գարիբյան,
Մ.Գ. Մելիք-Անդրեասյան, Է.Ս. Գեորգյան, Յու.Վ. Թադևոսյան

Խրոնիկական լիմֆոլեյկոզով հիվանդների արյան լիմֆոցիտներում ուսումնասիրվել են պլազմատիկ թաղանթների ֆոսֆոլիպիդների եւ չեզոք լիպիդների տարբեր քաղադրամասերում [14 C]արաքիդոնաթթվի կարճատև (5 վրկ) եւ երկարատև (60 րոպ) ներմուծման պրոցեսների շեղումները նորմայից:

Ստացված տվյալները վկայում են հիվանդագին տրանսֆորմացիայի ենթարկված լիմֆոցիտների բջջաթաղանթների լիպիդային քաղադրիչի առանձին քաղադրամասերում օգտագործված ճարպաթթվի արագ ներմուծման եւ հարաբերականորեն երկարատև վերաբաշխման կոուպերատիվ մեխանիզմներում առկա օրինաչափ խանգարումների մասին: Հատկանշական է, որ լիմֆոցիտային թաղանթների լիպիդային մոդիֆիկացիայի պրոցեսներում բացահայտված խանգարումներն առավել հստակ են արտահայտված 5 վրկ. ինկուբացիայի պայմաններում:

Եզրակացություն է արվում, որ խրոնիկական լիմֆոլեյկոզի պայմաններում լիմֆոցիտների լիպիդային մոդիֆիկացիաների մեխանիզմներում առկա հիվանդագին շեղումներն ունեն թաղանթ-կապված բնույթ:

REGULARITIES OF ARACHIDONIC ACID INCORPORATION INTO THE MEMBRANE LIPIDS OF NORMAL AND LEUKEMIC LYMPHOCYTES

A.Yu.Tadevosyan, T.B.Batikyan, L.Yu.Asatryan, A.L.Gharibyan,
M.G.Melik-Andreasyan, E.S.Gevorkyan, Yu.V.Tadevosyan

The alterations from norm in the processes of rapid (5 sec) and prolonged (60 min) incorporation of [14 C]arachidonic acid into the phospholipids and neutral lipids in plasma membranes of lymphocytes from patients with chronic lympholeukemia were investigated.

The data obtained have revealed that there are some specific defects in the co-operative mechanisms of fatty acid rapid incorporation and relatively prolonged redistribution into different fractions of lipid component of pathologically transformed lymphocyte plasma membranes. The revealed defects in lipid modification processes of lymphocyte membranes were more marked in conditions of 5 sec incubation. It is concluded that pathological changes in the lipid modification mechanisms of lymphocytes at chronic lympholeukemia have a membrane-bound character.

1. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Батикян Т.Б. и др. Биохимия, 1996, 61, с. 1414.
2. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Карагезян К.Г. Нейрохимия, 1992, 11, с. 194.
3. Тадевосян Ю.В., Карагезян К.Г., Батикян Т.Б. ДАН СССР, 1987, 295, с. 1254.
4. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Карагезян К.Г. Биол. журн. Армении, 1993, 46, с. 3.
5. Anderson L., McGregor A., Cook J.V. et al. Endocrinology, 1995, 136, p. 5228.
6. Balsinde J., Dennis E.A. Eur. J. Biochem., 1996, 235, p. 480.
7. Bligh E.G., Dyer W.I. Canad. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, p. 911.
8. Brashnahan B.A., Kelefiotis D., Stradidakis I., Lianos E.A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1996, 212, p. 165.
9. Bray G.A. Anal. Biochem., 1960, 1, p. 279.
10. Drummond A.H. J. Exp. Biol., 1986, 124, p. 337.
11. Gamberucci A., Fulceri R., Bygrave F.L., Benedetti A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 241, p. 312.
12. Gasanov S.E., Alsarraj M.A., Gasanov N.E., Rael E.D. J. Membr. Biol., 1997, 155, p. 133.
13. Hamasaki Y., Kobayashi I., Hayasaki R. et al. J. Ethnopharmacol., 1997, 56, p. 123.
14. Hirata F., Axelrod Y., Crews, F.T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, p. 4813.
15. Innes J., Runtz M.M., Kim Y.T., Weksler M.E. J. Clin. Invest., 1979, 64, p. 1608.
16. Jayadev S., Linardic C.M., Hannun Y.A. J. Biol. Chem., 1994, 269, p. 5757.
17. Maccarrone M., Nieuwenhuizen W.E., Dullens H.F. et al. Eur. J. Biochem., 1996, 241, p. 297.
18. Moore J.P., Johansson A., Hesketh T.R. et al. Biochem. J., 1984, 221, p. 675.
19. Murthy K.S., Makhlouf G.M. Mol. Pharmacol., 1995, 48, p. 293.
20. Nozawa Y., Nakashima S., Nagata K. Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1082, p. 219.
21. Reddy T.S., Bazan N.G. J. Neuroscience, 1987, 18, p. 449.
22. Visnjic D., Batinic D., Banfic H. Blood, 1997, 89, p. 81.
23. Wikiel H., Zhao L., Gessner T., Bloch A. Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1211, p. 161.
24. Yang D., Iwai H., Yamamoto A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1349, p. 25.