

**РОЛЬ МОДИФИКАЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ЛИПИДОВ МЕМБРАН  
ЛИМФОЦИТОВ В ИЗМЕНЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ  
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

**Е.М. Агаджанова**

*/ Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци,  
кафедра внутренних болезней N 2 и кафедра биохимии /  
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

*Ключевые слова:* сахарный диабет, липиды, опиатные рецепторы, лимфоциты

Среди многочисленных нарушений нейроэндокринной системы, сопутствующих сахарному диабету [15,28,32], в последние годы все большее внимание исследователей привлекают процессы опиоидергической нейротрансмиссии, в пользу участия которых в эндокринной секреции островков свидетельствует уже сам факт присутствия опиатных рецепторов на поверхности  $\beta$ -клеток [14,31]. Нас заинтересовали сравнительно недавно появившиеся сведения литературы о разнонаправленных изменениях ноцицепции, опосредуемых через отдельные типы опиатных рецепторов при сахарном диабете, биохимические механизмы которых на сегодняшний день практически не изучены [19,20,23,24,33].

В контексте вышеотмеченных проблем несомненный интерес представляет изучение возможности модификационных преобразований липидного бислоя плазматической мембраны, имеющих место непосредственно после оккупации рецептора соответствующим опиоидным лигандом. Согласно данным литературы, подобные быстрые (в течение 5 сек) модификационные преобразования имеют место в различных типах клеток в ответ на действие различных гормонов, нейротрансмиттеров и других физиологически активных соединений, в том числе агонистов и антагонистов опиатных рецепторов [1-3,6,8-10,27,29].

В связи с этим заслуживают внимания процессы деацилирования фосфатидилхолина (ФХ) — основного фосфолипидного компонента наружного слоя плазматической мембраны, в результате которых образуются лизофосфатидилхолин (ЛФХ) и незэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК). Как известно, долгие годы ЛФХ приписывалась роль цитолитического липидного фактора, и лишь исследования последнего десятилетия позволили выявить многочисленные физиологические эффекты этого соединения, в частности, стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию, процессы адгезии и дифференцировки лимфоидных клеток, активацию Т-лимфоцитов и агрегацию тромбоцитов [12,18,22]. Установлено, что ЛФХ образуется в клеточных мембранах под действием внешних сигналов самой разнообразной природы и влияет на эффект, оказываемый этими сигналами, что позволило ЛФХ получить статус вторичного мессенджера [5]. Образование ЛФХ имеет место при активации гормончувствительной фосфолипазы  $A_2$ . Активация фермента происходит под воздействием на клетки агонистов через G-белки и повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , которые способствуют транслокации фермента из цито-



плазмы в мембрану с образованием ЛФХ и НЭЖК [5,30]. Источником ЛФХ в клеточной мембране могут служить также липопотеины – основная транспортная форма липидов, где ЛФХ может образовываться под действием лецитинхолестеринацилтрансферазы.

Предотвращение накопления ЛФХ и НЭЖК – природных мембранолитических факторов в клетке происходит путем рециклирования ЛФХ соответствующими ацилтрансферазами с образованием полноценных фосфолипидов (ФХ). Следует отметить, что ацилирование лизоформ фосфолипидов, помимо защитной функции, представляет также альтернативный путь образования различных молекулярных форм фосфолипидов. В частности, в лимфоцитах этот путь включения жирной кислоты в фосфолипиды оказывается во много раз эффективнее их включения за счет синтеза *de novo* [6]. С целью выяснения возможного участия отмеченных процессов в гиперчувствительности к агонистам  $\delta$ -опиатных рецепторов *in vivo* предприняты исследования по изучению возможности быстрых модификационных преобразований фосфолипидов мембран лимфоцитов здоровых доноров в условиях быстрой (5 сек) инкубации с агонистом  $\delta$ -опиатных рецепторов дельторфином II.

#### Материал и методы

Исследование проведено на 35 больных сахарным диабетом, находившихся на стационарном лечении в отделении ПТИО клинического медобъединения №6 Ергорздравотдела в период с апреля по декабрь 2000 года. Лимфоциты выделяли по известной методике [17] в градиенте плотности раствора фиколл-верографина. Предварительное введение ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )-арахидоновой кислоты ("Amersham", Англия, сп. акт. 58,3 мКи, ммоль) в липиды лимфоцитов проводили в 5 мл инкубационной среды, содержащей  $\text{MgCl}_2\text{-}50$ , АТФ-12,5 КоА-1, дитиотриетол – 1 ммоль. В соответствии с требованиями эксперимента в инкубационную среду в качестве акцептора свободных жирных кислот вводили также 70 нмоль ЛФХ (Sigma). Остатки невключенной жирной кислоты убирали добавлением 15 мл раствора альбумина, свободного от примесей. После предварительного мечения суспензию клеток инкубировали в водяной бане 15–20 мин с целью установления метаболического равновесия процессов и включения оставшейся после промывки метки. К 0,2 мл клеточной суспензии добавляли раствор дельторфина II (Tocris) в конечной концентрации  $10^{-6}$  М. На 5-й секунде инкубации реакцию останавливали добавлением 2 мл холодной смеси хлороформ-метанола (2:1).

Экстракцию фосфолипидов и нейтральных липидов, их дальнейшее разделение методом тонкослойной хроматографии проводили известными методами [12]. Распределение радиоактивности идентифицированных в парах йода липидных фракций определяли сканированием пластин ТСХ на радиосканирующем приборе фирмы "Berthold" (Германия). Степень радиоактивности определяли на сцинтилляционном спектрофотометре "Roshe Bioelectronic" (Франция).

#### Результаты и обсуждение

Результаты исследований по изучению процессов включения и перераспределения  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислоты в отдельные фракции фосфолипидов свидетельствуют, что в лимфоцитах здоровых доноров преимущественное включение имеет место во фракцию фосфатидилхолинов ФХ. Распределение же в остальные фрак-



ции фосфолипидов имеет место примерно в равных соотношениях с определенным превалированием включения во фракцию кардиолипидов, что находится в соответствии с литературными данными, указывающими на аналогичные закономерности включения и перераспределения  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислоты в различных типах клеток [6,7,9]. Изучение закономерностей включения и распределения  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислоты в лимфоцитах больных сахарным диабетом свидетельствует о заметных сдвигах в отмеченных процессах, в частности, в условиях диабета значительно снижается включение арахидоновой кислоты во фракцию ФХ при одновременном повышении ее включения во фракцию ЛФХ и НЭЖК. Эти данные согласуются с результатами исследований по изучению жирнокислотного состава индивидуальных фракций фосфолипидов при экспериментальном аллоксановом диабете, продемонстрировавшими аналогичные закономерности в отношении большинства фосфолипидных фракций [21]. В совокупности с некоторыми сведениями литературы и результатами наших ранее проведенных исследований [11,25] эти данные свидетельствуют об активации процессов деацилирования фосфолипидов в условиях изученной патологии (рис.1).

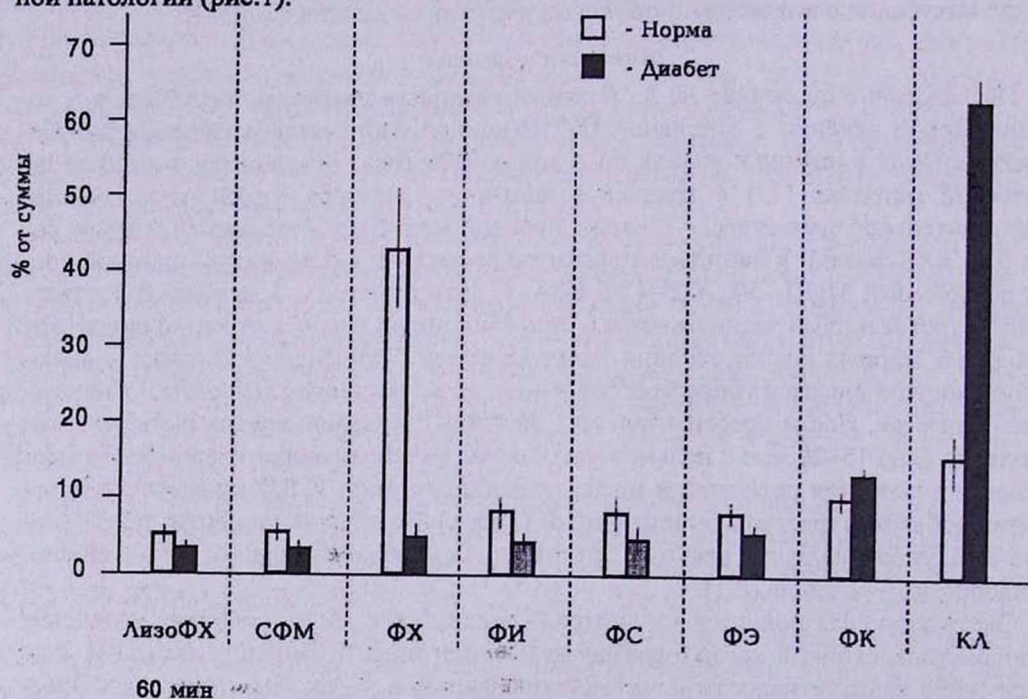


Рис. 1. Включение в процентное распределение  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислоты в фосфолипиды лимфоцитов периферической крови человека в норме и при сахарном диабете в течение 60 сек. Численные значения на оси ординат отражают % от суммы включенной в разные фосфолипиды радиоактивной арахидоновой кислоты.



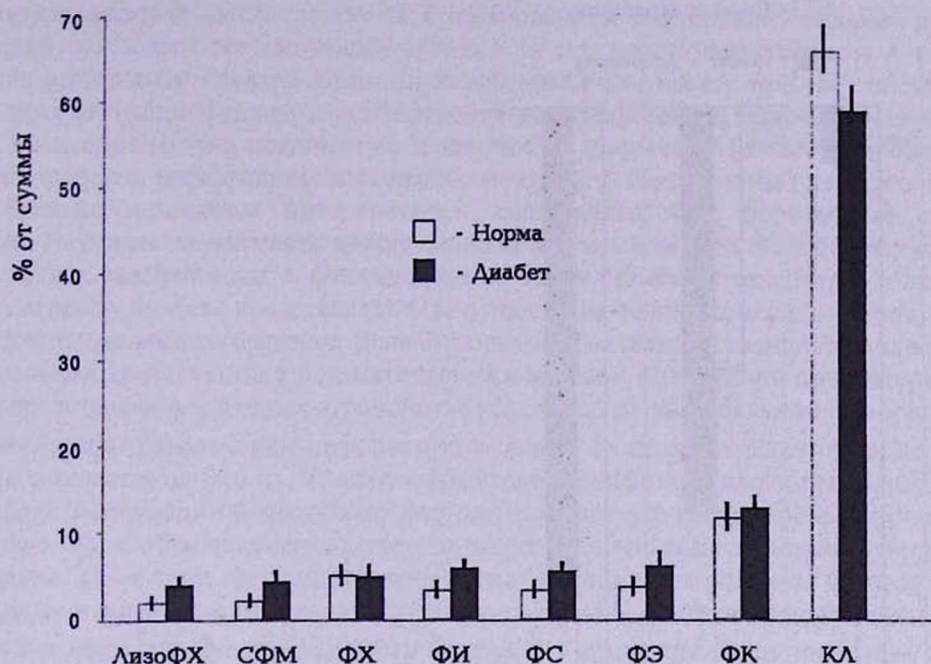


Рис. 2. Модификационные преобразования фосфолипидов лимфоцитов периферической крови человека в норме и при сахарном диабете в условиях 5-сек. стимуляции клеток. Численные значения на оси ординат отражают % от контроля (в качестве контроля взяты исходные уровни включения радиоактивности в исследованные фракции липидов).

Как явствует из рис. 2, при стимуляции клеток в течение 5 сек. Кона наблюдается определенная тенденция к активации включения  $^{14}\text{C}$ -арахидоновой кислоты во фракции ЛФХ, сфингомиелинов и фосфатидной кислоты, т.е. именно тех разновидностей ФЛ, которые, согласно данным литературы, непосредственно вовлечены в пути сигнальной трансдукции самых различных физиологически активных соединений [13]. При инкубации лимфоцитов здоровых доноров с дельторфином в концентрации  $10^{-6}\text{M}$  заметно снижается высвобождение по сравнению с контролем ФХ, что, возможно, свидетельствует о снижении интенсивности процессов деацилирования под влиянием этого соединения. Отмеченный факт, однако, невозможно однозначно интерпретировать, поскольку под влиянием испытуемого соединения уменьшается также (правда, в меньшей степени) выход ЛФХ и НЭЖК. Воздействие же этого вещества на лимфоциты больных сахарным диабетом приводит к существенно отличающейся от нормы картине в отношении арахидоновой кислоты и ЛФХ (рис.3).

Следует отметить, что на основании существующих литературных данных невозможно считать окончательно выясненным участие конкретного деацилирующего фермента (фосфолипазы  $A_1$ ,  $A_2$  или ЛФлипазы) в процессах деацилирования мембранных фосфолипидов в случае стимуляции разных типов клеток, а также в различные сроки воздействия стимулирующих факторов. Изменения в структуре



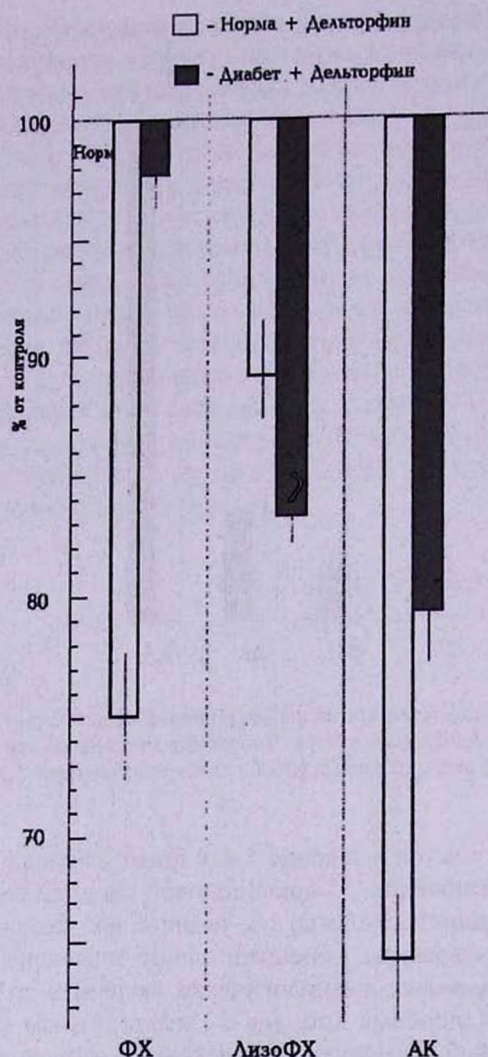


Рис. 3. Модификационные преобразования липидов лимфоцитов периферической крови человека в норме и при сахарном диабете в условиях 5-сек. инкубации с дельторфином.

бислая, происходящие после индукции клеток соответствующими лигандами, сопровождаются также активацией процессов рециклирования, в результате чего имеет место преимущественное обогащение фосфолипидов длинноцепочечными остатками. Отмеченные процессы имеют место в результате активации соответствующих ацилирующих ферментов. В частности, стимуляция лимфоцитов митогенами приводит к быстрой активации мембраносвязанной ацил-КоА-лизоФХ ацилтрансферазы [22,26]. Как следует из рис.2, в отмеченный срок воздействия испытуемого соединения имеет место также значительное уменьшение высвобождения свободной арахидоновой кислоты, которая является не только предшественником эйкозаноидов, выступающих в роли важных биорегуляторов, но наряду с другими НЭЖК имеет статус самостоятельного вторичного мессенджера [4,16]. Одновременно установлено, что ЛФХ и НЭЖК оказывают действие на активность фосфои-



нозитидзависимой фосфолипазы С с образованием соединений, которые в свою очередь оказывают регулирующее влияние на активность фосфолипазы А<sub>2</sub>. Изменения в липидном спектре плазматической мембраны клеток при их стимуляции, наряду с активацией цикла деацилирования-реацилирования, включают также другие пути обмена этих соединений, в частности, процессы трансметилирования и иные процессы межфракционных преобразований. В связи с этим предложены разнообразные механизмы интерпретации взаимосвязи этих ферментных систем [6,18]. Изучение взаимосвязи между функционированием этих ферментных систем в условиях сенситизации и блокады разных типов опиатных рецепторов в норме и при сахарном диабете представляет задачу наших дальнейших исследований.

Учитывая весьма сложные взаимоотношения различных липидных медиаторов сигнальной трансдукции в плазматической мембране, мы решили при интерпретации представленных данных ограничиться следующим: на начальном мембраносвязанном этапе транслокации информации агониста  $\delta$ -опиатных рецепторов дельторфина в качестве одного из механизмов быстрых модификационных преобразований мембран Т-лимфоцитов выступают ферментные системы деацилирования-реацилирования ФХ с образованием соответствующих вторичных мессенджеров липидной природы. Более того, продемонстрированные значительные различия в отмеченных процессах в норме и при сахарном диабете, возможно, свидетельствуют об их участии в изменениях чувствительности  $\delta$ -опиатной рецепторной системы при сахарном диабете.

Поступила 30.03.01

Автор выражает благодарность д.б.н. Тадевосяну Ю.В. и к.б.н. Батикян Т.Б. за помощь при проведении настоящего исследования, а также д.б.н. Вартамян Г.С. за ценные советы при обсуждении полученных данных.

ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ ԹՎԱՆԹՆԵՐԻ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՄՈԴԻՖԻԿԱՑԻՈՆ  
ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ՕՊԻԱՏԱՅԻՆ ՌԵՑԵՊՏՈՐՆԵՐԻ  
ԶԳԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅԱՆ ՄԵՋ ԸԱՔԱՐԱՆՏԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ե.Մ.Աղաջանովա

Զաքարախորը կապված է ներոտոկոնոլին համակարգի փոփոխությունների հետ՝ ներառյալ օպիոիդերգիկ ներդրմանամիսին: Մակայն դեռևս պարզված չէ շաքարախորի ժամանակ լիպիդների մոդիֆիկացիայի մասնակցությունը օպիադային ընկալիչների զգայունության փոփոխությունների ընթացքին:

Ազդանշանային տրանսդուկցիայի որոշ լիպիդային մեդիատորների դերը պարզաբանելու համար ուսումնասիրվել է  $\delta$ -օպիադային համակարգի սելեկտիվ ազդեցիկ դելտորֆին II-ի ազդեցությունը լիմֆոցիտային թաղանթներում լիպիդների արագ մոդիֆիկացիաների վրա:

Մրցված փվյալները վկայում են շաքարախորի ժամանակ նոնիցեպցիայի փոփոխության նշված պրոցեսների հնարավոր ընդգրկման մասին:

THE ROLE OF MEMBRANE LIPID MODIFICATION PROCESSES OF LYMPHOCYTES  
IN ALTERATIONS OF SENSITIVITY OF OPIATE RECEPTORS AT DIABETES MELLITUS

E.M. Agadjanova

Diabetes mellitus is associated with various alterations in neuroendocrine system, including opioidergic neurotransmission. However, it is not clear whether membrane lipid



modification processes take part in the alteration of sensitivity of different types of opiate receptors at diabetes conditions. In order to evaluate the possible role of some lipid mediators of signal transduction in these processes we have investigated the effect of  $\delta$ -opioid system selective agonist deltorphin II on the processes of lipid rapid modifications in lymphocyte membranes. The effects of deltorphin II on phospholipid deacylation-reacylation processes have been studied in both diabetic and non-diabetic cells in conditions of opioid receptor sensitization. The data obtained suggest possible involvement of the processes mentioned in the altered noniception at diabetes conditions.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аюбян В.П., Мелконян К.В., Батисян Т.Б. и др. Сб. науч.тр., посвящ. 70-летию ЕР-ГМУ им. М.Герацц. Ереван, 2000, с.387.
2. Вартанян Г.С. Автореф. дис. докт. Ереван, 1997.
3. Вартанян Г.С., Агаджанов М.И., Тадевосян Ю.В. и др. Бюл. экс. биол. и мед., 1996, 122,10, с.405.
4. Козтева Г.С., Безуглов В.В. Биохимия, 1998, 63, 1, с.6.
5. Проказина Н.В., Звездина Н.Д., Коротаева А.А. Биохимия, 1998, 63, 1, с. 38.
6. Тадевосян Ю.В. Автореф. дис. докт. Ереван, 1996.
7. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Карагезян К.Г. Нейрохимия, 1992, 11, 2, с.194.
8. Тадевосян Ю.В., Геворкян Э.С. Укр. биох. ж., 1990, 62, 4, с.103.
9. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Батисян Т.Б. и др. Биохимия, 1996, 61, 8, с.1414.
10. Agadjanov M.I., Vartanian G.S. Neurochemistry. Cellular, Molecular and Clinical Aspects. New York- London, 1997.
11. Agadjanov M.I., Vartanyan G.S., Tadevosian Yu.V., Agadjanova E.M. J.Molec.Med., 1998,76, p.53.
12. Bligh E.G., Dyer W.I. Canad J. Biochem. Physiol., 1959, 37, p. 911.
13. Biochemistry 4511: Biochemistry of lipids and membranes. Phospholipids as second messengers. Cop.1997, Mellissaa Gillis.
14. Fallucca T.J., Tomarini J., Di-Biase N. et al. Metabolism, 1996,45, 9, p.1065.
15. Hakamata H., Sasaki T., Yui S., Yamazaki M., Shichiri M., Horiuchi S. J.Biol.Chem., 1998, 269, p. 31430.
16. Hoek W.G., Ramesha C.S., Chang D.L. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1993, 90,10, p. 4475.
17. Innes J., Runtz M.M., Kim Y.T., Weksler M.E. J.Clin. Invest., 1979, 64, p.1608.
18. Nakano T., Raines E.W., Abraham J.A., Klagsburn M., Ross R. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1994, 91, p.1065.
19. Kamei J., Saitoh A., Ohsawa M. et al. Eur. J. Pharmacol., 1995, 276, (1-2), p.131.
20. Kamei J., Sodeyama M., Ohsawa M., Kimura M., Tanaka S. Life Sci., 1998, 62, 1, p.1.
21. Karaguezian K.G., Vartanian G.S., Agadjanov M.I., Panossian A.G., Hoult J.R.S. Planta medica, 1998, p. 1.
22. Kume N., Cybulsky M.I., Gimborne M.A. J.Clin.Invest., 1992, 90, p.1138.
23. Sakai M., Mizaki A., Hakamata H. et al. J.Biol.Chem., 269, p.31430.
24. Ohsawa M., Nagase H., Kamei J. J.Pharmacol.Exp.Ther., 1998, 286, 2, p.780.
25. Ohsawa M., Kamei J. Eur.J.Pharmacol., 1997, 339,1, p.27.
26. Reaven G.M. Diabetologia, 1995, 38, p.3.
27. Sir-Petermann T., Lopez G., Castillo T. Exp. Clin.Endocrinol. Diabetes, 1998, 106, p.389.
28. Takestvitia N., Yamaguchi I. Pharmacol.Biochem.Behav., 1998, 60, p.889.
29. Tandon M., Srivastava R.K., Nagpal R.K. et al. Eur. J.Pharmacol., 2000, 399, 2-3, p.161.
30. Vartanian G.S., Agadjanov M.I., Tadevosian U.V. J.Neurochemistry, 1997, 69, p.16.
31. Yokote K., Morisaki N., Zenobayashi N., Ueda S. et al. Eur.J.Biochem., 1993, 269, p.723.
32. Yogeve L., Yavetz H., Gottreich A. et al. Proc. Soc.Exp.Biol.Med., 1994, 205 (3), p. 248.
33. Yu L. Cell-Signal, 1996, 8, 5, p. 371.
34. Zurek J.R., Nadeson R., Goodchild C.S. J. Diabetes complications, 2000, 14,2, p.65.