

УДК 616-005.1-001.36-085.355:577.152.191]-036.8-07:616.36-018.1:576.314]-008.9
©Г.Ф.Лескова, Ю.В.Архипенко

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ЧАСТИЧНЫХ ОПИАТНЫХ АГОНИСТОВ БУПРЕНОРФИНА И БУТОРФАНОЛА НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ У КОШЕК.

Г.Ф.Лескова, Ю.В.Архипенко.

НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН,
125315 Россия, Москва, Балтийская ул., 8.
факс:(095)151-0421; эл.почта:4909.g23@g23.relcom.ru

Изучено влияние частичных опиатных антагонистов бупренорфина и буторфанала на фосфолипидный состав плазматических мембран гепатоцитов при геморрагическом шоке у кошек. Показано корригирующее действие бупренорфина в дозе 0,03 мг/кг на содержание фосфатидилинозитола. Бупренорфин в дозе 0,3 мг/кг вызывает дополнительное нарушение фосфолипидного состава плазматических мембран гепатоцитов, связанное с увеличением уровня фосфатидилсерина и снижением концентрации сфингомиелина и лизофосфатидилхолина. Буторфанол по сравнению с бупренорфином оказывает более выраженное защитное действие на гепатоциты.

Ключевые слова: бупренорфин, буторфанол, фосфолипиды, плазматические мембраны, гепатоциты, геморрагический шок.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что освобождающиеся при шоке в кровоток опиоидные пептиды вносят существенный вклад в возникающие в организме патологические процессы [1, 2]. Роль опиатов в патогенезе геморрагического шока связывают прежде всего с тем, что они вызывают значительную венодилатацию и выключают большой объем крови из центрального и периферического кровообращения [3]. Эндогенные опиаты могут выступать как нейротрансмиттеры, гормоны или нейромодуляторы, оказывая значительный эффект на метаболизм [1]. Считают, что в нормальных условиях активные и неактивные формы опиатных рецепторов клеточных мембран находятся в динамическом равновесии [4].

Данные о влиянии опиатных антагонистов на состояние сердечно-сосудистой системы при шоке противоречивы. С одной стороны, известно, что применение антагонистов опиатных рецепторов на фоне шока улучшает функцию сердечно-сосудистой системы [1]. С другой стороны, применение такого известного опиатного антагониста, как налоксон, в некоторых случаях не изменяло функционального состояния сердечно-сосудистой системы и не влияло на выживаемость животных [6]. Наконец, снижая опиатную аналгезию, налоксон в отдельных случаях может приводить к летальным нарушениям сердечно-сосудистой системы [6].

Препараты, обладающие сочетанным действием агонистов и антагонистов опиоидных пептидов, обнаруживают защитное действие на гемодинамику при различных моделях шока [7]. К ряду частичных опиатных агонистов относят бупренорфин и буторфанол. Бупренорфин (агонист-антагонист опиатных

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ШОКЕ

рецепторов) является высоко липофильным веществом и быстро растворяется в липидах клеточных мембран, вследствие чего возникает возможность его непосредственного влияния на липидную часть мембран [8]. Известно также, что одним из свойств антагониста-агониста опиатных рецепторов буторфанол является его способность увеличивать пул активных глюкокортикоидных рецепторов II типа печени, способных транслоцироваться в ядро клетки с последующей активацией ее генетического аппарата [9].

С учетом изложенного и, принимая во внимание тот факт, что с фосфолипидами связан ряд важнейших клеточных функций, была поставлена задача изучить возможность коррекции фосфолипидного состава плазматических мембран гепатоцитов у кошек, переживающих геморрагический шок с помощью частичных опиатных агонистов бупренорфина и буторфанол.

МЕТОДИКА. Опыты выполнены на 29 кошках массой $3,0 \pm 0,5$ кг под нембуталовым наркозом (40 мг/кг внутривенно). Геморрагический шок воспроизводили по методу Уиггера - Файна [10, 11]. Для предупреждения свертывания крови в катетерах животным вводили гепарин в дозе 2000 Ед/кг. Через 30 мин после введения гепарина выпускали кровь в резервуар, снижая давление до 40 мм рт.ст. в течение 30 мин и поддерживая его на этом уровне в течение 1 часа. Контролем к опытным группам служили интактные животные, которым вводили гепарин в указанной выше дозе. На фоне геморрагического шока изучали действие бупренорфина в дозах 0,3 и 0,03 мг/кг, а также буторфанол в дозе 0,5 мг/кг массы тела. Препараты вводили в/в через 30 мин от начала кровопускания. Материал для исследования у контрольных животных брали через 2 ч после введения гепарина, а у опытных - через 1,5 ч от начала кровопотери. Печень извлекали после ее перфузии охлажденным 1 мМ раствором NaHCO_3 . После выделения плазматических мембран гепатоцитов по методу [12] и экстрагирования из них общих липидов [13] фосфолипиды разделяли на фракции с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах "Silufol UV - 254" в системе растворителей: хлороформ - метанол - уксусная кислота - вода (25: 15: 4: 2, по объему) [14]. Хроматограммы денситометрировали, используя "Chromoscan - 201" фирмы "Jouze - Loebl". Обсчет денситограмм проводили на полуавтоматическом анализаторе изображений фирмы "Leitz - A.S.M.". Данные обрабатывали методом вариационной статистики по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Изменения фосфолипидного состава плазматических мембран гепатоцитов через 1,5 ч от начала кровопотери были связаны с фосфатидилинозитолом (ФИ) и фосфатидилхолином (ФХ), причем уровень ФИ оказался увеличенным в 6 раз ($p < 0,001$), а содержание ФХ снижалось в 3,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными показателями (рис. 1).

Обмен ФИ и ФХ плазматических мембран связан с реализацией биологической активности гормонов, участвующих в механизмах адаптации [15]. При этом гормоны проявляют свой эффект через опосредованную G-белком активацию фосфолипаз A_2 , C и D, следствием которой являются глубокие изменения клеточного метаболизма. В частности, продукты гидролиза ФИ и ФХ модулируют активность протеинкиназы C, играющей центральную роль в регуляции многих клеточных функций [16]. Вследствие того, что катаболизм ФХ связывают с механизмами регуляции, требующими длительной активации протеинкиназы C [17], гидролиз данного фосфолипида "более важен" для регуляции этого фермента, чем гидролиз ФИ [18]. Следует также отметить, что протеинкиназа C участвует в метаболизме ФХ через фосфорилирование фосфолипазы либо через фосфорилирование регуляторных белков (в частности, G-белка, соединяющего фосфолипазу D с рецептором [20]). Предполагают также, что рецепторсвязанная активация фосфолипазы C, расщепляющей ФХ, также регулируется протеинкиназой C [19]. Учитывая изложенное, следует ожидать, что при геморрагическом шоке поддержание активности протеинкиназы C в гепатоцитах в основном осуществляется за счет образования диглицеридов из ФХ,

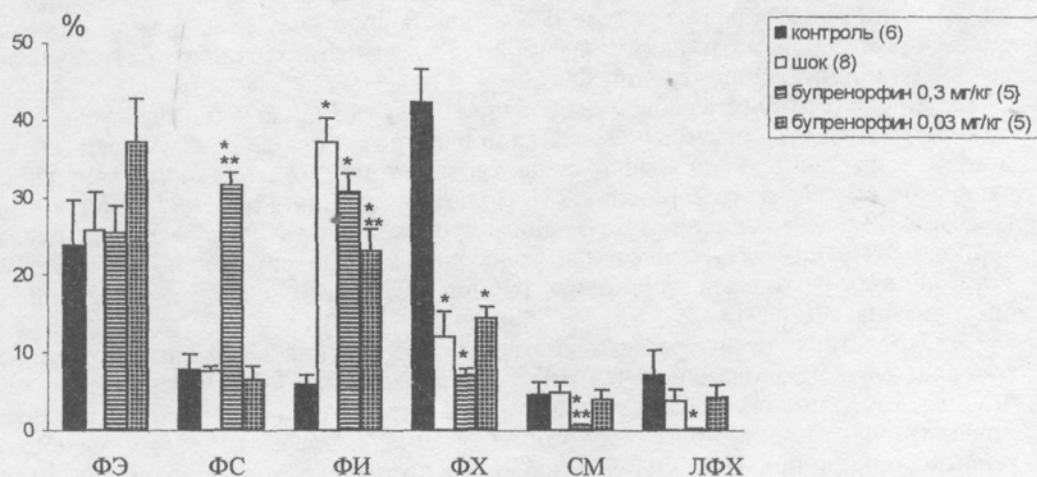


Рисунок 1.

Влияние бупренорфина на состав (в %) фосфолипидов плазматических мембран гепатоцитов у кошек, подвергнутых геморрагическому шоку. Здесь и на рис.2:

ФЭ - фосфатидилэтаноламин; ФС - фосфатидилсерин; ФИ - фосфатидилинозитол;

ФХ - фосфатидилхолин; СМ - сфингомиелин; ЛФХ - лизофосфатидилхолин.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными показателями.

содержание которого в плазматических мембранах гепатоцитов значительно уменьшается. При этом протеинкиназа С, в свою очередь, может оказывать активирующее влияние на катаболизм ФХ через активацию фосфолипаз и фосфорилирование регуляторных белков (в частности, G-белка). С другой стороны, известно, что гидролиз содержащих инозитол фосфолипидов плазматических мембран тесно связан с активацией большого количества рецепторов, использующих Ca^{2+} - зависимые пути внутриклеточной сигнализации [20]. Следовательно, накопление ФИ в плазматических мембранах гепатоцитов на стадии развитого геморрагического шока может свидетельствовать о повреждении механизма взаимодействия агонистов, стимулирующих распад ФИ, с мембранными рецепторами гепатоцитов и нарушении трансмембранной сигнализации.

Проведенные исследования показали, что бупренорфин, применяемый в дозе 0,03 мг/кг на фоне геморрагического шока, оказывает благоприятное воздействие на уровень ФИ в плазматических мембранах гепатоцитов: наблюдали его частичное восстановление на 30% ($p < 0,01$). С другой стороны, увеличение дозы бупренорфина до 0,3 мг/кг усугубляло нарушение фосфолипидного состава плазматических мембран гепатоцитов, вызванное геморрагическим шоком. Это было связано, в первую очередь, с фосфатидилсерином (ФС), уровень которого повышался в 4 раза ($p < 0,001$). Отмечали также снижение уровня сфингомиелина (СМ) и лизо-ФХ в 6,7 ($p < 0,01$) и 5,5 ($p < 0,02$) раза соответственно.

Таким образом, учитывая сведения о том, что метаболизм ФИ связан с передачей трансмембранных сигналов в клетках, а также с активацией протеинкиназы С, можно полагать, что частичная коррекция содержания ФИ в плазматических мембранах гепатоцитов при лечении геморрагического шока бупренорфином в дозе 0,03 мг/кг способствует нормализации внутриклеточного метаболизма. Однако применение бупренорфина в дозе 0,3 мг/кг может осложнять функциональные нарушения в гепатоцитах, вызванные геморрагическим шоком. В этой связи обращает на себя внимание увеличение уровня ФС. Известно, что липидная фаза представляет собой матрикс для рецепторов клеточных мембран и является существенной для взаимодействия агонистов с рецепторами [21]. В частности, установлено, что ФС обладает свойством увеличивать связывание опиоидных пептидов с рецепторами [21]. Показано также прямое взаимодействие

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ШОКЕ

опиоидных пептидов с ФС [22]. Учитывая эти факты, можно полагать, что применение бупренорфина в дозе 0,3 мг/кг способствует связыванию опиатов с рецепторами плазматических мембран гепатоцитов (в частности, за счет увеличения в них концентрации ФС).

Введение более высокой дозы бупренорфина (0,3 мг/кг) приводит к потере большей части СМ плазматических мембран гепатоцитов. В этой связи следует отметить имеющиеся данные о существовании пути сигнальной трансдукции, включающего СМ и его дериваты [23]. Полагают, что цикл обмена СМ аналогичен таковому ФИ, но в отличие от последнего происходит в течение более длительного периода и может быть вовлечен в более длительные изменения в клетке [24]. Установлено, что увеличенный распад СМ приводит к инактивации протеинкиназы С [23].

Представляет интерес воздействие бупренорфина, применяемого на фоне геморрагического шока в дозе 0,3 мг/кг, на уровень лизо-ФХ. Учитывая, что лизо-ФХ является модулятором активности ряда ферментов мембран [25], можно полагать, что уменьшение его концентрации в плазматических мембранах гепатоцитов при применении бупренорфина в дозе 0,3 мг/кг, в свою очередь, может отразиться на активности этих ферментов.

Как показали результаты исследования, применение буторфанолола в дозе 0,5 мг/кг у животных с геморрагическим шоком вызывало увеличение содержания фосфатидилэтаноламина (ФЭ) в плазматических мембранах гепатоцитов в 1,8 раза ($p < 0,01$) (рис. 2). Одновременно в плазматических мембранах гепатоцитов у животных, леченных буторфанололом, наблюдали дальнейшее снижение содержания ФХ, уровень которого оказался ниже в 2,6 раза ($p < 0,05$), чем у нелеченых животных. По сравнению с показателями нелеченых животных уменьшенной оказалась и концентрация СМ (в 3,3 раза ($p < 0,02$)).

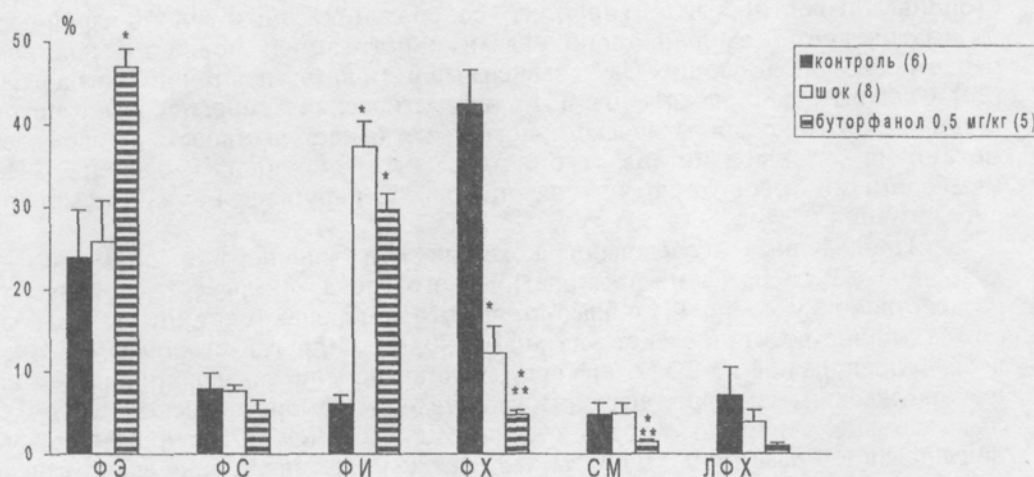


Рисунок 2.

Влияние буторфанолола на состав (в %) фосфолипидов плазматических мембран гепатоцитов у кошек, подвергнутых геморрагическому шоку.

Таким образом, при применении буторфанолола в дозе 0,5 мг/кг у животных с геморрагическим шоком в плазматических мембранах гепатоцитов имело место снижение уровня ФХ, сочетавшееся с уменьшением уровня СМ. В этой связи следует отметить работу [26], в которой показан один из возможных механизмов сочетанного распада холинсодержащих фосфолипидов (ФХ и СМ), связанный с активацией фосфолипазы С, контролирующей катаболизм ФХ, и сфингомиелиназы, контролирующей катаболизм СМ. При этом продукты распада

освобождаются в цитозоль. Другой механизм активации сочетанного распада ФХ и СМ связан с активацией фосфолипазы А₂ и сфингомиелиназы соответственно и с освобождением холинсодержащих продуктов распада во внешнюю среду [27]. Следует отметить, что дериваты СМ способны активировать освобождение кальция из внутриклеточных депо [28]. Учитывая приведенные данные, а также принимая во внимание, что у животных, леченных буторфанолом, плазматических мембранах гепатоцитов отмечается высокий уровень ФЭ, обладающего способностью усиливать действие кальциевого насоса [29], можно полагать, что применение буторфанола при геморрагическом шоке существенно способствует освобождению гепатоцитов от избытка ионов Са²⁺ и вносит вклад в поддержание внутриклеточного ионного гомеостаза.

Таким образом, в настоящих исследованиях установлено, что применение при геморрагическом шоке бупренорфина в дозе 0,3 мг/кг приводит к значительным изменениям фосфолипидного состава плазматических мембран гепатоцитов. Применение на фоне геморрагического шока бупренорфина в дозе 0,03 мг/кг сопровождается коррекцией фосфолипидного бислоя плазматических мембран гепатоцитов.

Другой антагонист-агонист опиатных рецепторов буторфанол воздействует на фосфолипидный состав плазматических мембран гепатоцитов у животных, подвергнутых геморрагическому шоку, способствует повышению содержания ФЭ, а также снижению уровня СМ и ФХ.

Проведенные исследования выявили значительные различия в механизмах воздействия на обмен фосфолипидов плазматических мембран гепатоцитов частичных агонистов опиатных рецепторов буторфанола и бупренорфина при геморрагическом шоке. Буторфанол оказывает более выраженное защитное действие на гепатоциты по сравнению с бупренорфином. Учитывая, что плотность глюкокортикоидных рецепторов цитоплазмы клетки лимитирует напряженность метаболического ответа [29], указанные различия можно объяснить тем, что бупренорфин в отличие от буторфанола дозозависимо снижает число мест связывания глюкокортикоидных рецепторов II и III типа печени [9]. Полученные данные подчеркивают важность коррекции функции глюкокортикоидных рецепторов II типа для усиления компенсаторных процессов в гепатоцитах при геморрагическом шоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berinton E., Long J.B., Holaday J.W. (1985) Fed. Proc., **44**, 290-299.
2. Molina P.E., Malek S., Lang C.H. et al. (1997) Neuroimmunomodulation., **4**, 36.
3. Vismara L.A., Leoman D.M., Lelis R. (1976) Circulation., **54**, 335-337.
4. Dun J.E., Herz A. Br. (1981) J. Pharm., **74**, 627-633.
5. Van Der Meer K., Valkenburg P.W., Bastiaans A.C. et al. (1986) Europ. J. Pharm., **124**, 299-308.
6. Guaracio P., Amato C.D., Sette P. et al. (1984) Br. Med. J., 363-364.
7. Donaldson M.D.J., Vesey K.J., Wilks M. et al. (1988) Circ. shock., **25**, 209-221.
8. Kagiwara M., Aoki K., Ishi K. (1986) Japan J. Pharmacol., **40**, 95-101.
9. Голиков П.П., Удовиченко В.И., Калинин В.Н. и др. (1996) Патол. физиол. и эксперим. терапия, № 1, 9-13.
10. Wiggers C.Y. (1950) Physiology of shock. N.Y.
11. Fine J. (1962) Shock: pathogenesis and therapy. London, 25-39
12. Поспелова А.В. (1977) в кн.: Современные методы в биохимии. / Под ред. В.Н. Орехова. М., 326-329
13. Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 911-917
14. Skipsky V.P., Barclay M. (1969) Meth. Enzym., **14**, 530-598

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ШОКЕ

15. Irving N.R., Exton J.H. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 3440-3443.
16. Nishisuka Y. (1986) Science, **233**, 305-312.
17. Kathayat R., Jaiswal A.S., Basir S.F. et al. (1997) Indian J. Exp Biol., **359**, 976.
18. Exton J.H. (1990) J. Biol. Chem., **256**, 1- 4.
19. Billah M.M., Anthes J.C. (1990) Biochem. J., **269**, 281-291.
20. Wang J.P., Kuo S. C. (1997) Biochem. Pharmacol., **53**, 1173-1177.
21. Белоконова О.С., Зайцев С.В. (1993) Биохимия, **58**, 1685-1708.
22. Vita F., Venturelli F., Roscetti G. et al. (1986) Int. J. Peptide Protein Res., **28**, 220-229.
23. Kolesnick R.N. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 7617-7623.
24. Hannun Y.A., Bell R.M. (1989) Science, **243**, 500-507.
25. Mookerjee S., Yung J.W.M. (1974) Can. J. Biochem., **52**, 1053-1066.
26. Kolesnick R.N., Hemer M.R. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 14057-14061.
27. Kolesnick R.N. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 16759-16762.
28. Ghosh T.K., Bian J., Gill D.L. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 22628-22635.
29. Yeagle P.L. (1989) FASEB J., **3**, 1833-1842.
30. Fabris B., Jackson B., Cubela R. et al. (1989) Clin. Exp. Pharm. Physiol., **16**, 309-313.

Поступила 10.10.00.

COMPARATIVE EFFECTS OF THE PARTIAL OPIATE AGONISTS BUPRENORPHINE AND BUTORPHANOL ON THE PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF LIVER CELL PLASMA MEMBRANES UNDER HEMORRHAGIC SHOCK IN CATS

G.F.Leskova, Yu.V.Arkhypenko

Institute of General Pathology and Pathophysiology Russian Academy of Medical Sciences
125315 Russia, Moscow, Baltiyskaya str., 8; e-mail: 4909.g23@g23.relcom.ru

Comparative effects of the partial opiate agonists buprenorphine and butorphanol on the phospholipid composition of liver cell plasma membranes were investigated in cats under conditions of hemorrhagic shock. Buprenorphine administration (0.03 mg/kg) normalized the level of phosphatidylinositol. The higher dose (0.3 mg/kg) induced additional disturbances in the phospholipid composition of liver cell plasma membranes by increasing the content of phosphatidylserine and by decreasing the contents of sphingomyelin and lysophosphatidylcholine. The protective effect of butorphanol on liver cells was more pronounced than that of buprenorphine.

Key words: buprenorphine, butorphanol, phospholipids, plasma membranes, liver cell, hemorrhagic shock.