*Биомедицинская химия, 2011 том 57, вып. 4, с. 420-428.*

УДК 577.125+577.151.05


# ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЛИПИДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ФОРБОЛ 12-МИРИСТАТ 13-АЦЕТАТ-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ЛЕЙКЕМИИ

***Т.Б. Батикян[1]*, Г.В. Акопян[1], М.П. Лазян[1], Т.Р. Торгомян[1], Р.А. Казарян[1], Е.С. Амирханян[2], Ю.В. Тадевосян[1]***

[1]Институт молекулярной биологии НАН РА, Армения, 0014 Ереван, ул. Асратяна, 7
[2]Гематологический центр им. Р.О. Еоляна МЗ РА, Армения, 0014 Ереван, ул. Нерсисяна 7

В норме и при остром лимфобластном лейкозе исследованы закономерности образования биологически активных липидных метаболитов в динамике (5, 10, 30, 60 с) стимуляции форбол 12-миристат 13-ацетатом лимфоцитов периферической крови, предварительно меченных [$^{14}$C]-пальмитиновой килотой. В норме обнаружено двухфазное образование 1,2-диацилглицеринов (5, 30 с) и лизофосфатидилхолина (10, 60 с), а также свободной пальмитиновой кислоты на 10 с стимуляции. В идентичных условиях эксперимента в лимфоцитах крови лейкемических больных выявлено подавление процессов высвобождения исследуемых липидов на ранних (5 и 10 с) этапах стимуляции. В относительно поздние (30, 60 с) сроки активации этих лимфоцитов обнаружены, в основном, схожие с нормой сдвиги в образовании содержащих пальмитиновую кислоту метаболитов, за исключением свободной пальмитиновой кислоты, уровень которой повышался только на 60 с после стимуляции.

В регуляцию уровней исследуемых липидов на отдельных этапах трансдукции сигнала как в нормальных, так и в бластных клетках вовлечены различные протеинкиназы С. Ранние (5, 10 с) сроки активации лимфоцитов здоровых доноров сопряжены с функционированием $Ca^{2+}$-независимых изоформ протеинкиназы, подавление которых в лейкемических клетках нормализует реакции высвобождения исследуемых липидных фракций.

Полученные данные указывают на нарушения ранних мембраносвязанных (5-10 с) реакций агонист- и протеинкиназа С-опосредованных процессов образования липидных метаболитов, содержащих пальмитиновую кислоту в лейкемических клетках по сравнению с нормой.

**Ключевые слова:** липиды, протеин киназа С, форбол 12-миристат 13-ацетат, лимфоциты, острый лимфобластный лейкоз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Одной из наиболее злободневных проблем современной биологии и клинической медицины являются вопросы, связанные с возникновением, развитием и терапией злокачественных новообразований, в том числе и в системе крови. Главной особенностью опухолевой клетки является её способность к нерегулируемой пролиферации, инвазии и метастазированию,

* - адресат для переписки

что в имеющейся в настоящее время литературе объясняется, главным образом, генетическими, химическими, радиационными или другими факторами. Результаты ранее проведенных исследований [1] закономерностей образования молекул 1,2-диацилглицеринов (1,2-ДАГ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и свободной ненасыщенной жирной кислоты (ЖК) в динамике (5-60 с) рецептор-опосредованной анти-CD3/CD28-стимуляции лимфоцитов, предварительно меченных [$^{14}$C]арахидоновой кислотой (АК), больных острыми миелобластным и лимфобластным формами лейкемий позволили нам сделать вывод о ранних (в течение первых 5-10 с активации) мембраносвязанных дефектах в метаболизме липидов этих клеток по сравнению с нормой. В связи с тем, что биологическая способность молекул липидных вторичных посредников к участию в процессах трансдукции внешних сигналов значительно зависит от их структуры, а также от функционального или патологического состояния клетки, является важным выявление механизмов образования и утилизации этих липидов, эстерифицированных ЖК с различной степенью насыщенности углеводородных цепей, в норме и при гемобластозах.

Первичной мишенью воздействия на клетку многочисленных эндогенных или внешних факторов (антигены, митогены и др.), инициирующих процессы клеточной дифференциации, пролиферации, апоптоза и др., является её плазматическая мембрана (ПМ). При этом происходит быстрая активация обратимых процессов модификации как белкового, так и липидного компонента липопротеинового бислоя ПМ. Модификационные превращения мембранных липидов реализуются путем активации ферментных систем их деацилирования, реацилирования, диэстеразного расщепления и др. Если ранние, быстропротекающие реакции липидной модификации осуществляются, в основном, внутримембранными механизмами, то при длительном воздействии на клетку внешних сигналов или на относительно поздних этапах сигнальной трансдукции вовлекается весь клеточный потенциал кооперативных метаболических превращений липидных молекул.

В литературе имеются многочисленные свидетельства об образовании как насыщенных ЖК-содержащих 1,2-ДАГ [2-4], ЛФХ [5-7], так и свободной пальмитиновой кислоты (ПК) [8-10], а также об участии их в процессах сигнальной трансдукции в относительно длительные сроки (минуты, часы) активации клеток путем вовлечения протеинкиназ С (ПКС) [12, 13]. Обнаружено также, что в агонист-индуцированном формировании клеточных ответов сами ПКС способны к регуляции активностей фосфолипаз (ФЛазы) С [11] и A$_2$ [6, 7]. Продуктом действия последней является ненасыщенная ЖК, главным образом АК, а, следовательно, и ЛФХ, эстерифицированный насыщенной ЖК. Однако, мало исследованы закономерности образования этих биологически активных липидных молекул, особенно на мембраносвязанных (в течение секунд после действия агониста) этапах стимуляции клеток как в норме, так и при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), а также функциональная роль различных ПКС в этих процессах.

Одним из методов выявления участия ПКС в метаболических процессах клетки является активация либо подавление их функционирования различными фармакологическими соединениями. Известными рецептор-неопосредуемыми активаторами ПКС являются форболовые эфиры, например, форбол 12-миристат 13-ацетат (ФМА), который, являясь структурным аналогом 1,2-ДАГ, связывается со специфическим регуляторным C1 доменом ПКС, способствуя их транслокации в ПМ [2]. Наиболее используемым методом выявления биологических эффектов Ca$^{2+}$-зависимых или независимых ПКС является использование ингибиторов ATP-связывающих доменов этого фермента. К числу последних относятся полифенольное соединение роттлерин, специфически подавляющий активности только Ca$^{2+}$-независимых изоформ ПКС и Go6850, являющийся одновременно ингибитором и Ca$^{2+}$-зависимых, и независимых изоформ этого фермента [14, 15].

Исходя из вышеизложенного, целью данных исследований явилось выявление закономерностей образования 1,2-ДАГ, -ЛФХ и свободной -ПК, а также функциональная роль активации различных ПКС в генерации этих липидов в динамике (5,10,30 и 60 сек) ФМА-стимуляции предварительно меченных [$^{14}$C]ПК лимфоцитов периферической крови практически здоровых волонтёров и больных ОЛЛ.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты проводили на лимфоцитах, выделенных [16] в градиенте плотности фиколл-верографина (1 часть 32,8% верографина и 2,4 части 8% водного раствора фиколла 400000, d=1,076-1,077) из периферической крови практически здоровых доноров и больных ОЛЛ. Тестировка трипановым синим обнаруживала, как правило, более 90% жизнеспособных клеток.

Предварительное мечение лимфоцитов ($10^6$ клеток/мл), [1-$^{14}$C]пальмитоил-КоА (уд. акт. 55 мкKu/ммоль, “Amersham”, Великобритания) осуществляли в течение 1 часа при 37°C в культуральной среде Игла (“Sigma”, США, pH 7,4), содержащей 50 мкМ $MgCl_2$, согласно общепринятой методике [17].

Далее клетки промывали в среде Игла и к 0,2 мл суспензии 1-[$^{14}$C]ПК-меченных лимфоцитов ($10^6$ клеток/мл) добавляли 0,3 мл аликвоты инкубационной смеси в присутствии (эксперимент) или отсутствие (контроль) ФМА (в конечной концентрации 50 нг/0,5 мл). В некоторых экспериментах лимфоциты были предварительно обработаны при 37°C в течение 30 мин ингибиторами ПКС “Calbiochem” – роттлерином (5 мкМ) или Go6850 (10 нМ) [14, 15]. Через 5, 10, 30 и 60 сек реакции останавливали 2 мл холодной смеси хлороформ/метанола (1:2, по объёму).

Экстракцию продуктов реакций проводили согласно методу Bligh и Dyer [18]. Липидные смеси фракционировали одномерной двухэтапной ТСХ на пластинках “Merck” (Германия). Разделение фосфолипидов (ФЛ) осуществляли в системе растворителей хлороформ-метанол-уксусная кислота–вода (25:15:4:2, по объёму). По достижении фронта растворителя середины пластинки, последнюю, высушив, помещали в камеру со смесью растворителей петролейный эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (30:20:1, по объёму) для фракционирования нейтральных липидов.

Распределение радиоактивности в идентифицированных соответствующими химически чистыми стандартами (“Sigma”,) и проявленных в парах йода липидных фракциях определяли сканированием ТСХ пластинок на радиосканере “Berthold” (Германия). Степень радиоактивности проб определяли в жидкости Брея на сцинтиляционном спектрометре “Roche-Bioelectronique Kontron”, модель SL-4221 (Франция).

Каждое экспериментальное условие воспроизводили в 3-5 независимых опытах по 3-5 параллелей каждое. Статистический анализ полученных данных производили согласно методу Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Многочисленные данные литературы свидетельствуют [2-4], что образование 1,2-ДАГ, эстерифицированных насыщенной и/или мононенасыщенной ЖК, из мембранных фосфатидилхолинов (ФХ) происходит в условиях относительно длительной (минуты, часы) активации клеток форболовыми эфирами, в том числе и ФМА. Результаты наших экспериментов обнаружили (рис. 1) двухфазное увеличение (от контрольного) содержания 1-[$^{14}$C]пальмитоил-2-ацил-ДАГ на 5 и 30 сек ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров. В идентичных условиях эксперимента в клетках больных ОЛЛ выявлено монофазное высвобождение ДАГ только на 30 сек стимуляции, что указывает на подавление механизмов раннего (5 с) высвобождения пальмитоил-ДАГ в лимфоцитах больных ОЛЛ по сравнению с нормой. Относительно более длительные (10-60 с) инкубации ОЛЛ лимфоцитов с агонистом приводили к идентичным (по отношению к норме) сдвигам ДАГ, содержащих пальмитиновую кислоту.

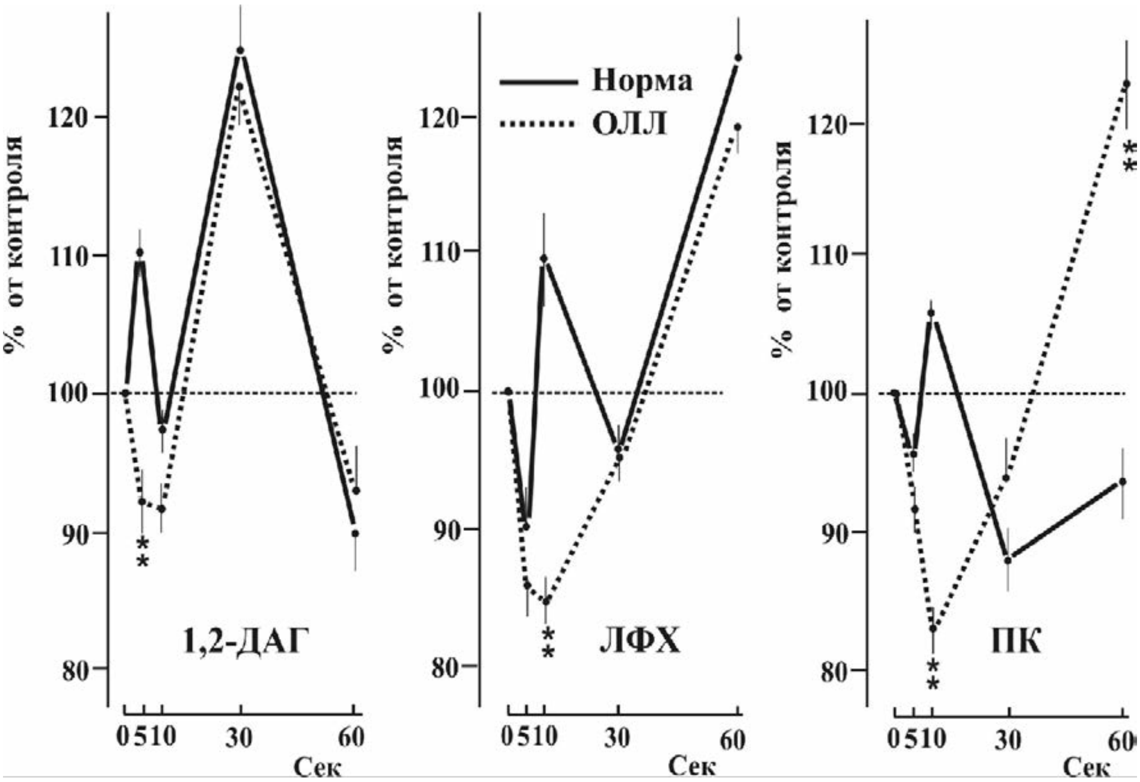


**Рисунок 1.**
Образование пальмитоил-ДАГ, -ЛФХ и свободной ПК в динамике ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров и больных ОЛЛ. Здесь и на следующих рисунках: * - $p<0,05$; ** - $p<0,001$.

Исследование количественных сдвигов в содержании ПК-содержащих ЛФХ и свободной ПК обнаружило ингибирование процессов образования последних на 10 с ФМА-стимуляции лейкемических клеток по сравнению с нормой.

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о подавлении реакций не только диэстеразного расщепления, но и деацилирования мембранных ФЛ на ранних (5, 10 с) этапах стимуляции ОЛЛ клеток по сравнению с нормой.

Далее нами была проведена серия аналогичных вышеописанным экспериментов, но в условиях предварительной инкубации клеток с роттлерином или Go6850, подавляющими [14, 15] активности $Ca^{2+}$-независимых и $Ca^{2+}$-зависимых/независимых изоформ ПКС, соответственно. В норме нами обнаружено уменьшение (по сравнению с данными без ингибиторов) содержания 1,2-ДАГ вне зависимости от типа использованного ингибитора. Интересно, что на 5 с стимуляции лимфоцитов здоровых доноров на фоне значительного понижения (на 30% от контрольного) уровня 1,2-ДАГ в условиях подавления $Ca^{2+}$-независимых ПКС, обнаружено некоторое повышение содержания этого липида при подавлении $Ca^{2+}$-зависимых/ независимых изоформ этого фермента, что указывает на активацию $Ca^{2+}$-независимых ПКС в ранних, мембраносвязанных (5 с) процессах ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров. Примечательна нормализация (рис. 2Б) процесса образования 1,2-ДАГ на 5 с активации лейкемических клеток в условиях ингибирования $Ca^{2+}$-независимых ПКС. Динамики количественных изменений в содержании 1,2-ДАГ в остальные временные промежутки стимуляции ОЛЛ лимфоцитов, обработанных как роттлерином, так и Go6850 незначительно отличались от данных, полученных в экспериментах без ингибиторов.

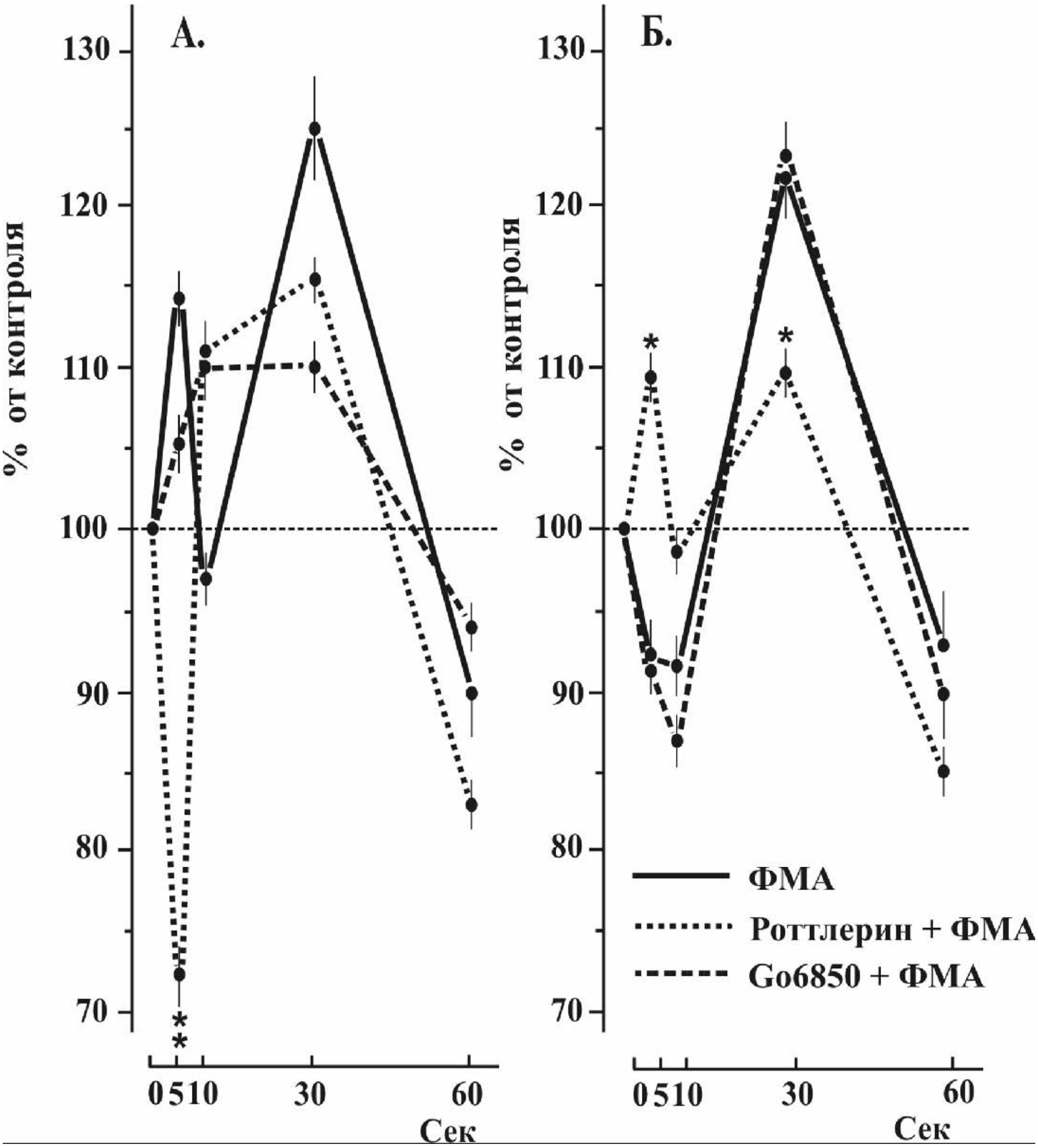


**Рисунок 2.**
Эффекты роттлерина и Go6850 на образование 1,2-ДАГ в динамике ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров (А) и больных ОЛЛ (Б).

Согласно литературным данным, индукция активности ПКС в условиях стимуляции клеток различными внешними факторами, в основном, связана с транслокацией её цитозольных изоформ к ПМ и связыванием с мембранными 1,2-ДАГ. Однако, ранее в ПМ тромбоцитов, фибробластов и других клетках и клеточных линиях были идентифицированы мембрано-ассоциированные ПКС, активирующиеся в условиях действия на них различных агонистов [19-21]. Исходя из вышеизложенного, представленные на рисунке 2 данные позволили нам предположить, что на фоне вовлечения различных ПКС в регуляцию уровней

1,2-ДАГ на отдельных этапах стимуляции нормальных лимфоцитов, ранние мембраносвязанные (5 с) процессы трансдукции ФМА-сигналов сопряжены с функционированием мембраносвязанных $Ca^{2+}$-независимых изоформ ПКС. В лимфоцитах больных ОЛЛ нормализация процессов образования 1,2-ДАГ связана с подавлением также $Ca^{2+}$-независимых ПКС на 5 с сигнальной трандукции.

Интересные закономерности были нами обнаружены и в результате исследований эффектов ингибиторов ПКС на образование продуктов деацилазных активностей (ЛФХ и ПК) в динамике ФМА-стимуляции ОЛЛ лимфоцитов по сравнению с нормой. Ингибирование $Ca^{2+}$-независимых ПКС роттлерином практически не влияло на динамику количественных сдвигов ЛФХ здоровых доноров (рис. 3А), в то время как обработка этих клеток Go6850, подавляющим активности $Ca^{2+}$-зависимых/независимых ПКС приводила (рис. 3Б) к понижению уровня ЛФХ до уровня ниже контрольного на 10 с стимуляции. В клетках ОЛЛ на 10 с действия ФМА выявлено (рис. 3Б), напротив, сходное с нормой повышение уровня этого липида на 10 с в условиях подавления $Ca^{2+}$-независимых ПКС. Эти данные дают нам возможность предположить вовлечение $Ca^{2+}$-зависимых ПКС в регуляцию уровней пальмитоил-ЛФХ на 10 с стимуляции нормальных клеток и $Ca^{2+}$-независимых ПКС – при ОЛЛ.

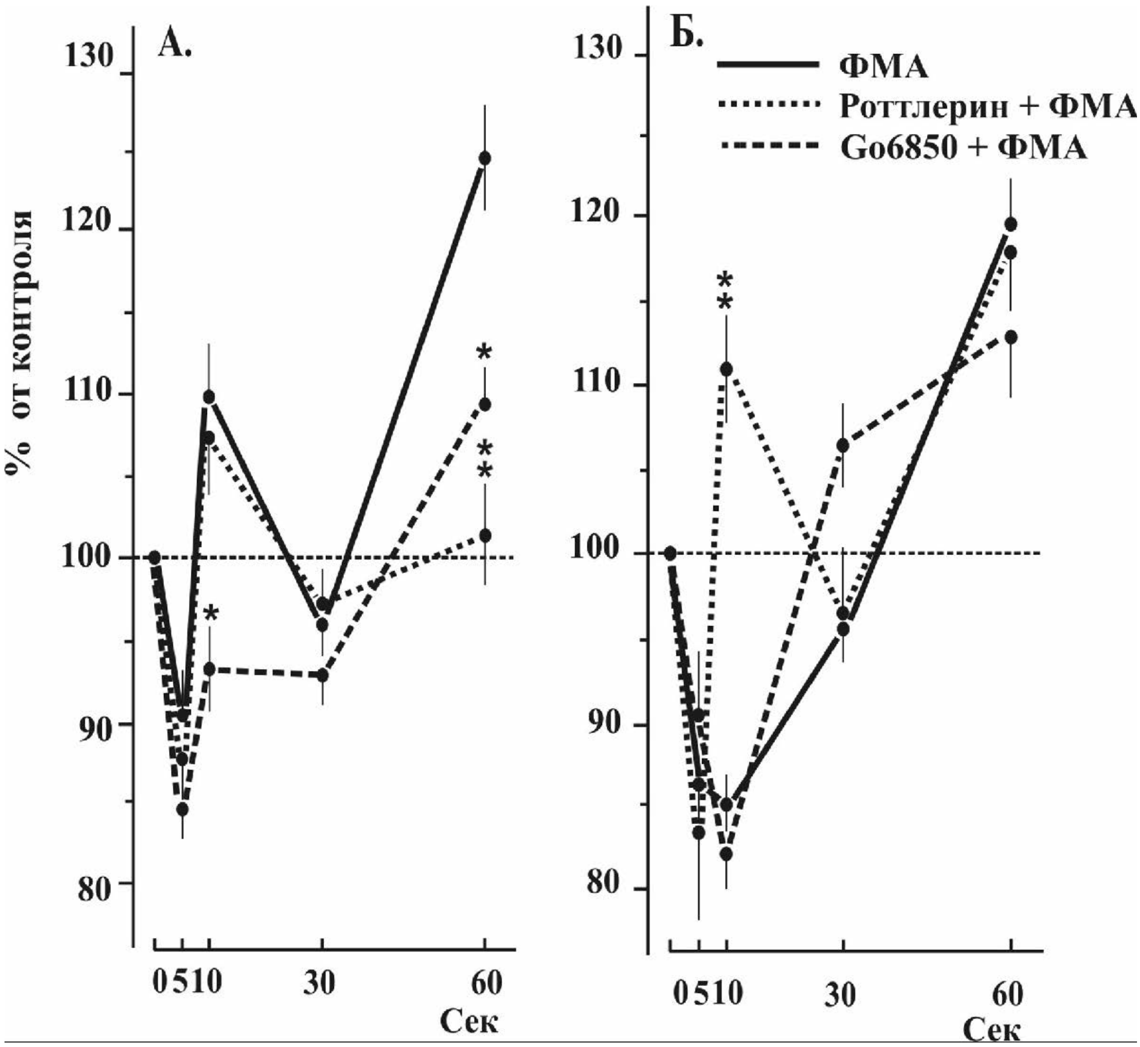


**Рисунок 3.**
Эффекты ингибиторов ПКС на образование ЛФХ в динамике ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров (А) и больных ОЛЛ (Б).

Предварительная обработка лимфоцитов здоровых доноров и роттлерином и Go6850 приводила (рис. 4А) к резкому понижению уровней свободной ПК во все временные промежутки стимуляции клеток. В отличие от нормы, в лейкемических клетках кратковременная (5 с) активация вызывала накопление этой ЖК, вне зависимости от типа использованного ингибитора. Начиная с 10 с действия ФМА происходило стабильное повышение и понижение содержания этой свободной ЖК в условиях подавления $Ca^{2+}$-зависимых и $Ca^{2+}$-зависимых/независимых изоформ ПКС, соответственно.

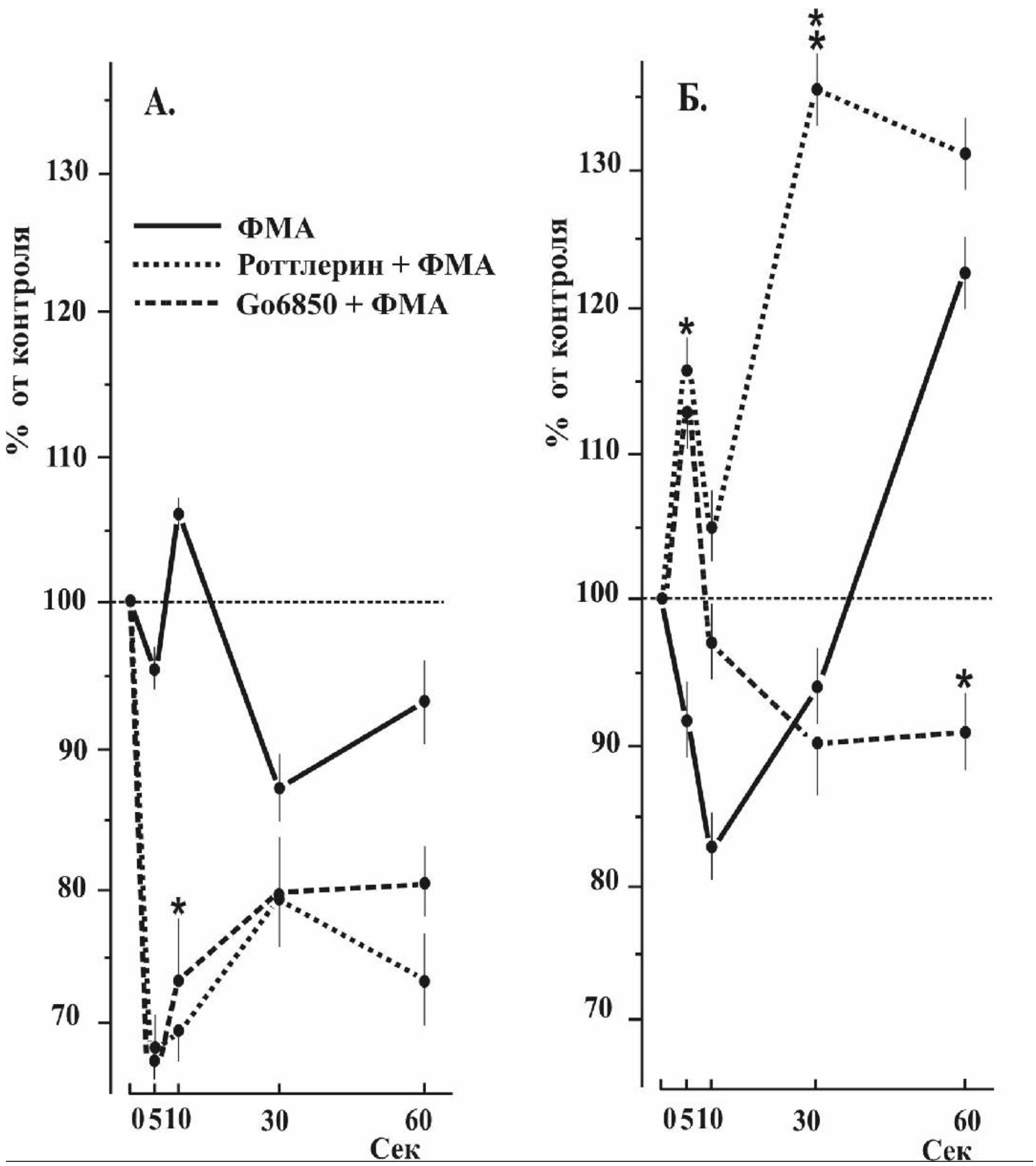


**Рисунок 4.**
Эффекты роттлерина и Go6850 на высвобождение ПК в динамике ФМА-стимуляции лимфоцитов здоровых доноров (А) и больных ОЛЛ (Б).

Таким образом, в механизмы высвобождения пальмитол-ДАГ, -ЛФХ и свободной ПК в отдельные сроки активации как нормальных, так и бластных лимфоцитов вовлечены различные ПКС. Подавление $Ca^{2+}$-независимых изоформ ПКС приводит к нормализации процессов их образования на ранних (5-10 с) этапах стимуляции ОЛЛ лимфоцитов.

Обобщая представленный экспериментальный материал можно заключить о выявлении нами нарушений в мембраносвязанных (5-10 с) агонист- и протеинкиназа С-опосредованных процессах образования ПК-содержащих метаболитов липидного обмена лейкемических клеток по сравнению с нормой.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Мелконян М.Г., Акопян Г.В., Тадевосян А. Ю., Батикян Т.Б., Амирханян Е.С., Альтман А., Тадевосян Ю.В.* (2007) Мед. наука Армении, **2**, 58-63.
2. *Brose N., Rosenmund C.* (2002) J. Cell Science, **115**, 4399-4411.
3. *Exton J.H.* (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1212**, 26-42.
4. *Graba L.T., Kearns M.W., Morris A.J., Daniel L.W.* (2004) Biochim. Biophys. Acta, **1636**, 29– 39.
5. *Asaoka Y., Oka M., Yoshida K., Sasaki Y., Nishizuka Y.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 6447-6451.
6. *Проказова Н.В., Звездина Н.Д., Коротаева А.А.* (1998) Биохимия, **63**, 31-37
7. *Bassa B.V., Roh D.D., Vaziri N.D., Kirshenbaum M.A., Kamanna V.S.* (1999) Am. J. Physiol., **277**, 328-337.
8. *Zacharias D.A., Violin J.D., Newton A.C., Tsien R.Y.* (2002) Sceince, **296**, 913-916.
9. *Eyster K.M.* (2007) Adv. Physiol. Educ., **31**, 5–16.
10. *Calder P.C., Yaqoob P.* (2007) J. Nutr., **137**, 545–547.
11. *Diaz-Flores E., Siliceo M., Martinez-A.C., Merida I.J.* (2003) J. Biol. Chem., **278**, 29208-29215.
12. *Parolini I., Topa S., Sorice M., Pace A., Ceddia P., Montesoro E., Pavan A., Lisanti M.P., Peschle C., Sargiacomo M.J.* (1999) J. Biol. Chem., **274**, 14176–14187
13. *Villalba M., Bi K., Hu J., Altman Y., Bushway P., Reits E., Neefjes J., Baier G., Abraham R.T., Altman A*. (2002) J. Cell Biology, **157**, 253–263
14. *Soltoff S.P.* (2001) J. Biol. Chem., **276**, 37986-37992.
15. *Villalba M., Bi K., Hu J., Altman Y., Bushway P., Reits E., Neefjes J., Baier G., Abraham R.T., Altman A*. (2002) J. Cell Biology, **157**, 253–263
16. *Innes J., Runtz M.M., Kim Y.T., Weksler M.E.* (1979) J. Clin. Invest. **64**, 1608-1613.
17. *Manning R., Sun G.Y.* (1983) J. Neurochem., **41**. 1735-1743.
18. *Bligh E.G., Dyer W.I.* (1979) J.Clin.Invest., **64**, 1608-1613.
19. *Plewin R., Cook S.J., Palmer S., Wakelam M.J.O.* (1991) Biochem. J., **279**, 559-565.
20. *Chaikin E., Ziltener H.J., Razin E.* (1990) J. Biol. Chem., **265**, 22109-22116.
21. *Chakravarthy B.R., Whitfield J.F., Durkin J.P.* (1994) Biochem. J., **304**, 809-816.


Поступила: 15. 04. 2009.

**REGULARITIES OF ENDOGENOUS LIPID METABOLITES FORMATION IN PHORBOL 12-MIRISTATE 13-ACETATE-STIMULATED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AT LEUKEMIA**

***T.B. Batikyan*[1]*, G.V. Hakopyan*[1]*, M.P. Lazyan*[1]*, T.P. Torgomyan*[1]*, R.A. Kazaryan*[1]*,***
***E.S. Amirkhanyan*[2]*, Yu.V. Tadevosyan*[1]**

[1]Institute of Molecular Biology NAS AR, Hasratyan str., 7, Yerevan, 0014 Armenia
[2]Yeolyan Hematologic Centre AR, Nersisyan str., 7, Yerevan, 0014 Armenia

Regularities of biologically active lipid metabolites formation in dynamics (5, 10, 30, 60 s) by phorbol 12-miristate 13-acetate stimulation in [$^{14}$C]palmitic acid have been investigated in normal and leukemia peripheral blood lymphocytes prelabeled with [$^{14}$C]palmitate. In normal cells there was two-phase formation of 1,2-diacylglycerol (5, 30 s), lysophosphatidylcholine (10, 60 s), as well as free palmitic acid at 10 s of stimulation. Under the identical experimental conditions there was inhibition of investigated lipid release processes at early (5 and 10 s) stages of stimulation of leukemic lymphocytes. At later (30, 60 s) terms of these lymphocytes the activation, basically, similar to norm changes in the formation of palmitic acid-containing metabolites except free palmitic acid (the level of which raised only at 60 second of the post-stimulation) was found.

Various protein kinases C are involved in the regulation of investigated lipid levels at certain stages of signal transduction both in norm, and in blast cells. Short-term (5, 10 s) activations of healthy donors lymphocytes are coupled to functioning of $Ca^{2+}$-independent isoforms of protein kinase C. The inhibition of this protein kinase C in leukemic cells leads to normalization of the investigated lipid release.

The data obtained suggests disorders of early membrane-bound reactions in agonist - and a protein kinase C-mediated processes of formation palmitic acid-containing lipid metabolites in the leukemic cells in comparison with the norm.

**Key words:** lipids, protein kinase C, phorbol 12-myristate 13-acetate, lymphocytes, acute lymphoblastic leukemia.