

БИОХИМИЯ

УДК 577.1 + 577.15 + 547.953.61

Ս. Ա. Կազարյան<sup>1,3</sup>, Տ. Տ. Դաղբաշյան<sup>1</sup>, Ա. Ա. Գալոյան<sup>2</sup>

**Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний**

(Представлено 27/X 2010)

**Ключевые слова:** лейкозы, лимфопролиферативные заболевания, мембранные белки, АТФазы, фосфолипиды

Для оценки функциональной активности тканевых клеток при различных патологических состояниях вполне обоснованную информацию дает исследование структурно-функциональной организации биомембран. Нарушение физиологического состояния клетки сопровождается определенными изменениями в липидном спектре биомембран, приводящими к изменениям метаболизма белков мембран. Вместе с тем увеличение числа лимфопролиферативных заболеваний (ЛПФЗ) диктует необходимость более глубокого изучения биохимических механизмов нарушенных метаболических процессов и разработки методов терапии [1-3].

В настоящей статье исследованы особенности изменений белковых и липидных компонентов биомембран, деятельность фосфоинозитидной сигнальной системы и некоторых мембраносвязанных ферментов, а также мембранные аспекты патогенеза ЛПФЗ и их осложнений и разработка информативных критериев прогнозирования, диагностики и оценки эффективности проводимой терапии.

**Материал и методы.** Изучали кровь 52 больных ЛПФЗ, в частности пациентов с острым лимфолейкозом (ОЛЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), лимфогранулематозом (ЛГМ), множественной миеломой и лимфомами.

Для выделения мембранных эритроцитов к 4.5 мл крови добавляли 0.5 мл 1.05% раствора оксалата натрия, перемешивали и центрифугировали при 1000 g (15 мин). Осадок (эритроцитарная масса) дважды промывали изотоническим

раствором NaCl и центрифугировали. Отмытую эритроцитарную массу суспендировали в буферном растворе, содержащем 0.01 М NaHCO<sub>3</sub> и 0.003 М NaCl с ЭДТА (1:5) и центрифугировали 40 мин при 12000 g на центрифуге К-24. Осадок дважды промывали с последующим центрифугированием при 12000 g. Процедуру повторяли еще 2 раза в трис-HCl буфере [4]. Лимфоциты получали из цельной крови в градиенте свежеприготовленного раствора фикола – верографина (1 часть 32.8% верографина и 2.4 части 8% водного раствора фикола – 400, d=1.076-1.077). Лимфоциты осаждали и суспендировали (10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> клеток/мл) в минимальной основной среде Игла (pH=7.4).

В мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови больных исследовали состояние компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы, индивидуальных фосфолипидов (ФЛ) и их соотношений, адениловой системы, активность фосфолипазы A<sub>2</sub>, Na/K-, Ca- и Mg-АТФаз, а также 5'-нуклеотидазы (5'-НТ). Фракционирование индивидуальных фосфолипидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии [5] в модификации П.А.Казаряна [6] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (ЧССР). Определение активности фосфолипазы A<sub>2</sub> проводили в лимфоцитах и эритроцитарных мембранах спектрофотометрическим методом [1] в модификации П.А. Казаряна [6].

Фракционирование адениловых нуклеотидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии [6] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (ЧССР). Идентификацию нуклеотидов производили с помощью свидетелей (стандартов), а затем в каждой фракции определяли количество неорганического фосфора [8]. Количество нуклеотидов рассчитывали по формуле с использованием коэффициентов молярных экстинкций Аткинсона [9]. Активность АТФаз определяли по модифицированному методу Ху и соавт. [10], основанному на регистрации прироста неорганического фосфора в среде в ходе АТФазной реакции, активность 5'-НТ – по методу Музбека и соавт. [11]. Фракционирование компонентов фосфоинозитидного цикла проводили методом тонкослойной хроматографии [12] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк в системе хлороформ:метанол:аммиак. Экстракцию и разделение фосфатидной кислоты проводили также методом тонкослойной хроматографии [5] в модификации П.А.Казаряна [6].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью критериев достоверности и различий Фишера – Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенных исследований свидетельствуют об особенностях изменений липид-липидных соотношений в мембранах эритроцитов (рис. 1) и лимфоцитов крови больных ЛПФЗ, что проявляется в значительном изменении качественного и количественного

состава почти всех классов мембранных фосфолипидов (ФЛ) и их соотношений.

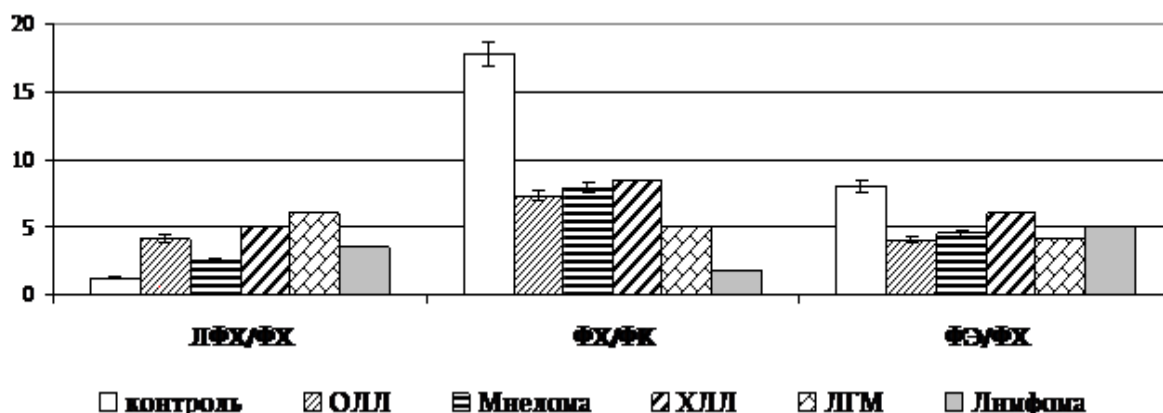


Рис. 1. Изменение коэффициентов ФЛ/ФЛ соотношений в мембранах эритроцитов крови при ЛПФЗ

Примечательно, что во всех изученных нозологиях ЛПФЗ как в эритроцитарных, так и лимфоцитарных мембранах резко повышается уровень цитотоксичных и мембранолитических лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), а также коэффициент соотношения ЛФХ/фосфатидилхолины (ФХ) ( $p < 0.001$ ), что указывает на преобладание процессов деградации глицерофосфолипидов. Эти изменения наиболее выражены при лимфомах, ХЛЛ и ОЛЛ.

В лимфоцитах крови больных неходжкинскими лимфомами коэффициент ЛФХ/ФХ повышается семикратно (7.5 против контрольных 1.0). При этом в мембранах эритроцитов и лимфоцитов резко ( $p < 0.001$ ) снижается коэффициент соотношения ФХ/фосфатидная кислота (ФК), что свидетельствует о подавлении процессов фосфатидогенеза, наиболее выраженном при лимфомах и ЛГМ.

Резкое (многократное) снижение коэффициента соотношения ФХ/ФК в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови больных ЛПФЗ обусловлено значительным уменьшением содержания ФХ и накоплением промежуточных продуктов липогенеза, в частности, основных промежуточных продуктов метаболизма фосфатидов-глицеридов.

Исследование коэффициента соотношения фосфатидилэтаноламина (ФЭ)/ФХ, позволяющего судить о состоянии процессов их взаимопревращений и изменениях микровязкости липидного бислоя в эритроцитарных и лимфоцитарных мембранах при ЛПФЗ, выявило статистически достоверное снижение его при всех изученных нозологиях крови.

Исследование уровня компонентов адениловой системы выявило значительное снижение уровня АТФ в эритроцитах и лимфоцитах крови на

фоне повышения ( $p < 0.01$ ) содержания аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозиндифосфата (АДФ). Примечательно, что картина изменений адениловых нуклеотидов при всех изученных патологиях и их осложнениях аналогична предыдущим показателям.

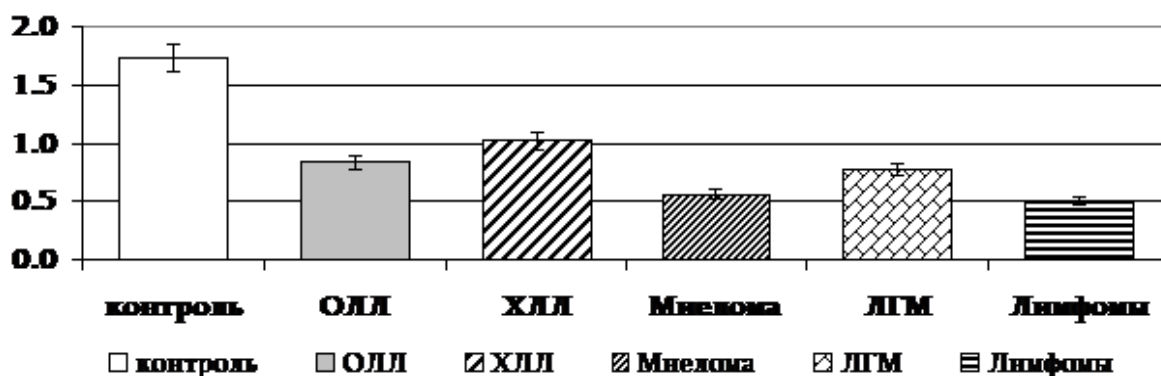


Рис. 2. Изменение активности 5'-НТ в эритроцитах крови при ЛПФЗ

Нет сомнений, что в основе выявленных изменений лежит развивающаяся при этом гипоксия с усилением анаэробного окисления углеводов и подавлением процессов окислительного фосфорилирования. Нам представляется, что статистически достоверное снижение уровня основного энергетического субстрата – АТФ может привести к развитию энергетического кризиса, что было доказано в наших предыдущих исследованиях [14]. Накопление же содержания АДФ и АМФ указывает на нарушение метаболизма этих важнейших соединений, в частности, биосинтеза цАМФ, вторичного мессенджера аденилатциклазной сигнальной системы.

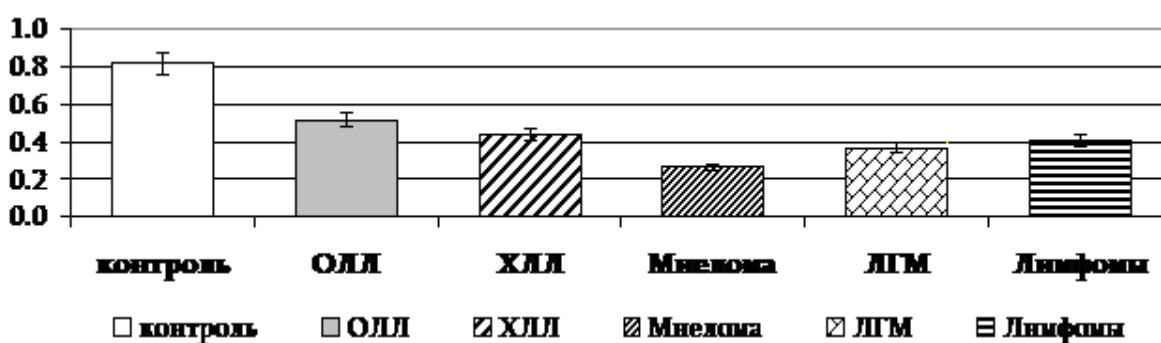


Рис. 3. Изменение активности 5'-НТ в лимфоцитах крови при ЛПФЗ

В условиях патологии наблюдается также значительное ( $p < 0.01$ ) изменение активности маркерного фермента 5'-НТ как в эритроцитах, так и лимфоцитах крови (рис. 2, 3). Подавление активности 5'-НТ в эритроцитах крови наиболее выражено при множественной миеломе и лимфомах, а в

лимфоцитах наблюдается подавление активности фермента при миеломной болезни и ЛГМ.

Интересные закономерности выявлены в отношении ион-транспортных систем при указанных состояниях организма. В условиях патологии в эритроцитах и лимфоцитах крови уровень Na/K-АТФазы повышается при миеломной болезни и ЛГМ (рис. 4, 5). При других нозологиях он заметно ингибирован, особенно при ХЛЛ и ОЛЛ. Эти изменения сопровождаются также изменением Mg- и общей АТФазной активности как в эритроцитах, так и лимфоцитах крови. Активность Mg-АТФазы в эритроцитах заметно возрастает (за исключением у больных ОЛЛ).



Рис. 4. Изменение активности АТФаз в эритроцитах крови при ЛПФЗ

Несколько иная картина наблюдается в лимфоцитах крови больных ЛПФЗ. Так, при миеломе и ХЛЛ отмечается повышение активности фермента. При других нозологиях, особенно при ОЛЛ и ЛГМ, она значительно ( $p < 0.01$ ) подавляется.



Рис. 5. Изменение активности АТФаз в лимфоцитах крови при ЛПФЗ

Вышеизложенное позволяет заключить, что ЛПФЗ характеризуются существенными нарушениями как липидных, так и белковых компонентов биомембран, что несомненно указывает на информативность определения

указанных показателей при оценке метаболических и, возможно, патогенетических нарушений.

Для выяснения биохимических механизмов нарушения процессов метаболизма мембранных липидов была исследована активность фосфолипазы  $A_2$  в эритроцитах и лимфоцитах крови обследованных больных. Установлено резкое усиление деятельности этого фермента при всех нозологических формах. Эти изменения в эритроцитах наиболее выражены при ОЛЛ и лимфомах, а в лимфоцитах — при ОЛЛ и ЛГМ. Полученные данные в условиях патологии согласуются с приведенными выше данными о резком увеличении содержания цитотоксичных ЛФХ и уменьшении уровня ФХ. Изменения активности фосфолипазы  $A_2$ , запускающей "каскад" реакций арахидоновой кислоты с образованием простагландинов — медиаторов воспаления, указывают на углубление воспалительных процессов.

Особый интерес представляют результаты последующего изучения состояния компонентов фосфоинозитидного цикла при ХЛЛ. Выявилось значительное изменение содержания как полифосфоинозитидов, так и фосфатидной кислоты в мембранах эритроцитов крови при изучаемой патологии.

Относительное содержание монофосфоинозитидов (ФИ) в мембранах эритроцитов крови больных резко (более чем двукратно) возрастает по сравнению с этим показателем у здоровых. Уровень фосфоинозитид-4-фосфата (ФИ-4-Ф) и фосфатидилинозитид-4,5-дифосфата (ФИ-4,5-Ф) при этом статистически достоверно понижается. При этом наблюдается накопление фосфатидной кислоты (ФК).

Таким образом, хронический лимфолейкоз приводит к значительному нарушению метаболизма фосфоинозитидов, что подтверждается статистически достоверными ( $p < 0.001$ ) изменениями. Обнаруженные количественные и качественные изменения могут быть обусловлены подавлением активности фосфоинозидспецифичной фосфодиэстеразы, катализирующей синтез полифосфоинозитидов. Наблюдаемое при этом резкое накопление ФК, являющейся предшественником синтеза полифосфоинозитидов и большинства классов фосфатидов-глицеридов, может вызвать дестабилизацию биомембран с последующим нарушением их функциональной активности. Нет сомнений, что изменение уровня важнейших компонентов фосфоинозитидного цикла может привести к подавлению функциональной активности биомембран, тем самым оказывая влияние на защитные механизмы иммунной системы.

Обобщая вышеизложенное, можно прийти к заключению, что изучаемые биохимические показатели, в частности липид-липидные соотношения, ак-

тивность фосфолипазы  $A_2$ , Na/K- и Mg-АТФаз, содержание адениновых нуклеотидов, а также компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы, могут быть использованы в качестве информативных тестов для прогнозирования и оценки степени тяжести исследуемых заболеваний [13, 14].

Из вышеизложенного следует также, что ЛПФЗ характеризуются существенным нарушением метаболизма липидных и белковых компонентов мембран как эритроцитов, так и лимфоцитов крови. Как показывают результаты наших предыдущих исследований, существующие в настоящее время методы химиотерапии не приводят к заметной нормализации качественного и количественного состава липидных и ионтранспортных ферментных систем, как и некоторых маркерных белков мембранных структур, а следовательно, и стабилизации биомембран и в целом их функциональной активности [14].

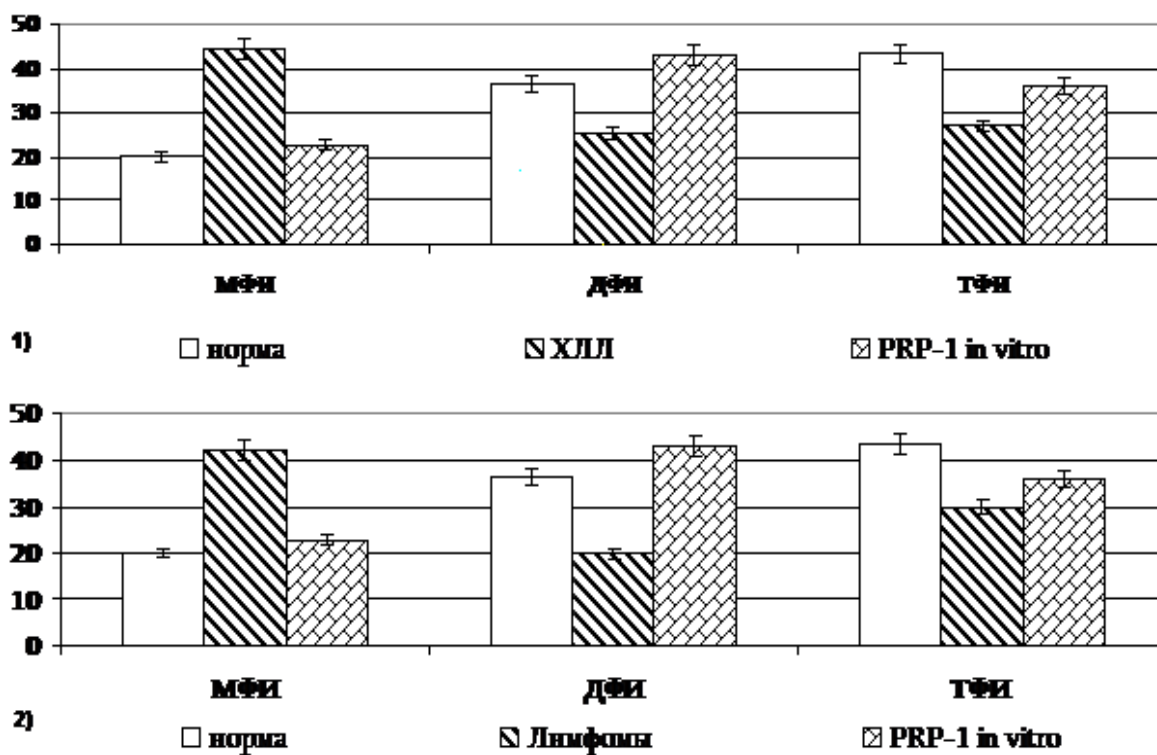


Рис. 6. Изменения компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы при ХЛЛ (1), лимфомах (2) и после применения *in vitro* PRP-1

Для лечения ЛПФЗ особый интерес представляют полученные акад. А.А.Галояном и сотр. новые цитокины мозга, в частности галармин, расшифровка их первичной структуры [17]. Нами *in vitro* изучалось состояние липидных и белковых компонентов биомембран у онкогематологических больных после применения природного препарата — гипоталамического

богатого пролином полипептида (PRP-1), выделенного акад. А.А.Галояном из головного мозга животных (рис. 6).

Выявлено, что препарат оказывает положительный эффект как регулятор метаболизма основных классов мембранных липидов, в частности фосфолипидов, и деятельности ион-транспортных систем (Na/K- и Mg-АТФаз, а также общей АТФазной активности). Так, PRP-1 в условиях *in vitro* приводит к почти полной нормализации компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы, в частности МФИ,ДФИ и ТФИ, как в мембранах эритроцитов, так и в лимфоцитах крови больных ХЛЛ. Примечательно, что в эритроцитах и лимфоцитах крови обследованных больных наблюдается также нормализация относительного содержания всех классов мембранных фосфолипидов, уровня ПОЛ и активности фосфолипазы А<sub>2</sub>. Аналогичная картина имеет место и в деятельности основных показателей ион-транспортных систем в мембранных структурах клеток крови как при ХЛЛ, так и при лимфомах.

Итак, гипоталамический богатый пролином полипептид является активным регулятором метаболизма основных компонентов биологических мембран у онкогематологических больных.

<sup>1</sup>Гематологический центр им. проф. Р.Еоляна МЗ РА

<sup>2</sup>Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

<sup>3</sup>Ереванский государственный университет

**П. А. Казарян, С. С. Дагбашян, академик А. А. Галоян**

### **Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний**

Исследованы изменения спектра фосфолипидов (ФЛ), ФЛ/ФЛ соотношений, компонентов адениновой системы и фосфоинозитидного цикла, активности 5'-нуклеотидазы, Na/K- и Mg-АТФазы и фосфолипазы А<sub>2</sub> в эритроцитарных и лимфоцитарных мембранах при лимфопролиферативных заболеваниях.

Установлено, что онкогематологические заболевания характеризуются существенным нарушением метаболизма липидных и белковых компонентов мембран как эритроцитов, так и лимфоцитов крови. Показано, что природный гипоталамический богатый пролином полипептид (PRP-1) оказывает положительный эффект как регулятор метаболизма основных классов мембранных липидов и деятельности ион-транспортных систем.



**Պ. Ա. Ղազարյան, Ս. Ս. Դաղբաշյան, ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան**

**Լիմֆոպրոլիֆերատիվ հիվանդությունների ախտաճնության և թերապիայի  
թաղանթային ասպեկտները**

Ուսումնասիրվել են ֆոսֆոլիպիդային կազմի, նրանց հարաբերակցության գործակիցների, ադենինային համակարգի բաղադրամասերի, 5'-նուկլեոտիդազայի, Na/K-ԱՆՖազայի, Mg-ԱՆՖազայի, ԱՆՖազային ընդհանուր ակտիվության և ֆոսֆոլիպազա Ա<sub>2</sub> ակտիվության, ինչպես նաև մոնոֆոսֆո-, դիֆոսֆո-, եռֆոսֆոինոզիդիդների և ֆոսֆատիդային թթուների պարունակության փոփոխությունների առանձնահատկությունները էրիթրոցիտների և լիմֆոցիտների թաղանթներում սուր և բրոնխիակալի լիմֆոլեյկոզների, լիմֆոգրանուլոմալոպոզի, լիմֆոմաների և միելոմաների ժամանակ և հիպոթալամուսից անջարված պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի (PRP-1) in vitro ազդեցության ներքո:

Նաստարված է, որ ուսումնասիրված կենսաքիմիական ցուցանիշները կարող են օգտագործվել ինչպես լիմֆոպրոլիֆերատիվ հիվանդությունների կանխորոշման, այնպես էլ բուժման արդյունավետության գնահատման նպատակով:

**P. A. Ghazaryan, S. S. Daghbashyan, academician A. A. Galoyan**

**Membranous Aspects of Pathogenesis and Therapy at Lymphoproliferative Diseases**

Phospholipids fractions and their relations, adenine system components, 5'-nucleotidase, Na/K and Mg-ATPhase, ATPase general and phospholipase A<sub>2</sub> activity, as well as monophospho- diphospho-, triphosphoinositides and phosphatides acids' substance exchange features in erythrocyte and lymphocyte membrane in critical/sharp and chronic lymphatic leukemia, lymphogranulomatosis, lymphoma and myeloma cases and under the effect of proline rich polypeptide (PRP1) in vitro extracted from hypothalamus have been investigated.

The investigated biochemical indicators are proven to be used not only in diagnosis of lymphoproliferative illnesses but also in the evaluation of treatment effectiveness.

**Литература**

1. Воробьев А.И., Яхина Е.И., Самойлова Р.С. - Тер. архив. 1995. Т. 67. N7. С. 3-7.
2. Воробьев А.И., Горелов В.Г., Городецкий В.М., Шулутко Е.М. Критические состояния при гемобластозах (типичные формы и выживаемость в условиях отделения реанимации). Печень при гемобластозах, Новосибирск. 1999. 414 с.
3. Воробьев А.И., Кременецкая А.М., Лорие Ю.Ю., Харaziшвили Д.В, Шкловский-Корди Н.Е. - Тер. архив. 2000. N 7. С. 9-13.

4. *Limber G.K., Davies R.F., Bakerman S.* - Blood. 1970. V. 36. P. 111.
5. Хроматография в тонких слоях (под ред. Шталя Э.). М. 1965. 508 с.
6. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы (распределительный и адсорбционный). М. Изд. ЦОЛИУВ. 1982. 28 с.
7. *Grassl M., Moeliring H.* - Anal. Chem. 1969. Bd. 243. S. 416-423.
8. *Светашев В. И.* Микротехника анализа липидов и ее использование. Автореф. канд. дис. Владивосток. 1973. 79 с.
9. *Atkinson D.E.* In: Cellular energy metabolism. 1<sup>st</sup> Regulation Academic. Press. 1977. V. 15. P. 26-29.
10. *Hu Y-K., Eisses J.F., Kaplan J.H.* - J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 30734-30739.
11. *Muszbeek L., Szabo T., Fesus L.* - Analyt. Biochem. 1977. V. 77. P. 286-288.
12. *Зубер В.Л.* Методы биохимических исследований. Л. 1982. 75 с.
13. *Daghbashyan S.S., Pepanyan A.A., Ghazaryan P.A., Asoyan A.H.* In: 15<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association. June 10-13. 2010. Barcelona. Abstr. 1372.
14. *Ghazaryan P.A., Daghbashyan S.S., Asoyan A.H., Pepanyan A.A. et al.* In: 33<sup>rd</sup> World Congress of the International Society of Hematology. Jerusalem, Israel, 2010. Abstr. A-228-0006-00462.
15. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004. 188 p.
16. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus - Endocrine Heart. Moscow. Nauka Publ. 1997. 240 p.
17. *Lajtha A.* Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology (Ed. Galoyan A.A., Besedovsky H.). Neuroimmunology, Springer, 3<sup>rd</sup> Edition. 2009.