

ՀՈՂՎԱԾՆԵՐ - СТАТЬИ

Биол. ж. Армении, т. 40, № 12, 979-985, 1987

УДК 577.1

КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ФОСФОЛИПИДОВ В КРОВИ И МОЗГЕ КРЫС
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ Са-дс-РНК

А. Г. КАРАГЕЗЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, С. С. ОВАКИМЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
лаборатория липидов и лаборатория нуклеиновых кислот, Ереван

Показано, что активация фосфолипазы A_2 и повышение уровня лизофосфолипидов, обладающих иммуномодулирующей активностью, обуславливает адъювантные свойства двуспиральной РНК.

Ցույց է տրվել, որ A_2 ֆոսֆոլիպազի ակտիվացումը և խոնամազոցում ազդող ակտիվ լիզոֆոսֆոլիպիդների մակարդակի բարձրացումը պայմանավորում են էրկադյանների ԴՆԲ-ի ադյուվանտային հատկությունները:

It has been shown that the activation of phospholipase A_2 and the increasing of the level of lyso-phosphatidylcholines, which have immunomodulate activity, play an important role in the conditioning of adjuvant properties of ds RNA.

Ключевые слова: двуспиральная РНК, лизофосфолипиды, фосфолипиды, мозг, кровь.

Двуспиральные РНК (дс-РНК) известные как индукторы интерферона, стимуляторы первичного и вторичного иммунного ответа, участвуют в регуляции активности 2'-5' олигоаденилатсинтетазы и дс-РНК-зависимой протеинкиназы. До настоящего времени остается невыясненным механизм иммуностимулирующей активности двуспиральных форм РНК. Последние могут быть отнесены к категории веществ, оказывающих неспецифическое стимулирующее воздействие на процессы антителообразования, и, как правило, наиболее активные из них стимулируют активность фосфолипаз A_1 и A_2 , катализирующих реакции расщепления фосфолипидов (ФЛ) до свободных, неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) и поверхностно-активных лизопроизводных различных ФЛ, преимущественно лизофосфатидилхолинов (ЛФХ).

Механизм активации отмеченных выше фосфолипаз различными иммуностимуляторами остается неизученным, хотя имеются указания

относительно модулирующего влияния ЛФх на адьювантный эффект в опытах *in vivo*. Следовательно, не исключено, что ЛФх сами по себе также наделены иммуностимулирующими свойствами. Эти положения нашли свое подтверждение в исследованиях на мышах [1], продемонстрировавших угнетающее воздействие ЛФх на развитие специфической иммунной толерантности на нативный бычий гамма-глобулин и стимулирующее влияние на процесс антителообразования к этому антигену. В связи с этим интересно отметить, что некоторые лизопронизводные ФЛ, как уже стало известно, обладают мощным стимулирующим действием на процесс формирования гуморального и клеточного иммунного ответа. Более того, установлено, что под влиянием этих факторов усиливается тормозное действие макрофагов на рост раковых клеток с избирательным расстройством в них процессов фосфолипидного метаболизма. Антионкологическое действие лизопронизводных ФЛ, по всей вероятности, обусловлено нарушением постоянства фосфолипидного окружения многих мембраносвязанных липидзависимых ферментов. Как известно, к категории последних относятся и глюкозилтрансферазы, катализирующие реакции образования циклических нуклеотидов — цАМФ и цГМФ, а также ферменты, участвующие в образовании простагландинов, причастность которых к регуляции процессов иммунитета в настоящее время не вызывает сомнений.

Изложенное выше послужило основанием для проведения специальных исследований по изучению действия де-РНК на качественный и количественный состав ФЛ головного мозга и цельной крови белых крыс.

Материал и методы. В работе использовали де-РНК, полученную из тотальной РНК дрожжей. Фракционирование, концентрирование и очистку препаратов де-РНК проводили по методу Кроуэнберга и Хемфри [12]. Полученные препараты титровали в качестве двуспиральных молекул [3]. Молекулярная масса полученных препаратов де-РНК составляла 20×10^3 — 150×10^4 Дальтон.

Са-преципитат де-РНК получали по способу Грахама и Виздер Эби [10]. Биологически активной комплекс Са-де-РНК, как показали исследования, устойчив к расщеплению нуклеазами плазмы крови и экстракта тканей [4].

Экстракцию ФЛ производили по Фолду [3] из предварительно полученных ацетонных порошков исследованных тканей. Фракционирование ФЛ осуществляли методом Мариветти и Стоппа [13] в модификации Каратезина [5] по однокмернойходящей хроматографии на фильтрах ФН-11 (ГДР), пропитанных кремниевой кислотой. Количество ФЛ выражали в мкг липидного фосфора на 1 г влажной мозговой ткани и 1 мл цельной крови. Де-РНК вводили крысам внутривенно из расчета 10 мг/кг массы. Полученные результаты обрабатывали статистически по системе Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение. Как вытекает из табл. 1, спустя 15 и 30 мин после введения де-РНК в мозговую ткань белых крыс заметно снижается содержание всех фракций ФЛ. Эти сдвиги по степени выраженности не одинаковы, в результате чего резко нарушается филогенетически стабилизированное постоянство липид-липидных соотношений, имеющее важное значение для обеспечения физиологического статуса данной биологической системы [6, 7]. Возникновение патологических отклонений обусловлено главным образом нарушением липидного окружения, характерного для многих мембраносвязанных ферментов, при-

Таблица 1. Изменение различных фракций ФЛ (γ Р в/1 гр) в мозговой ткани белых крыс под действием дс-РНК через 15 и 30 мин после введения

Время введения препарата, мин	Лфх	Мфиф*	Сфм	ФХ	ФС	ФЭ	Сумма Нфл	Сумма Кфл	К $\frac{Нфл}{Кфл}$	Сумма
Контроль	64.3±8.06	99.5±0.76	244.0±0.95	752.0±1.94	204.7±0.47	347.0±1.2	1323.0±5.6	368.5±1.3	3.6	1691.0±10.0
дс-РНК 15	43.8±11.25 p=0.1	47.2±2.9 p<0.001	126.5±7.6 p<0.001	557.0±27.6 p<0.001	235.5±8.7 p=0.01	227.5±11.9 p=0.001	925.0±4.8 p=0.001	326.5±1.8 p=0.01	2.8	1251.6±18.1 p<0.001
дс-РНК 30	41.3±1.6 p<0.01	61.1±4.1 p<0.001	187.8±10.0 0.01>p>0.002	507.6±5.1 p<0.001	217.3±9.06 p=0.25	183.4±3.8 p<0.001	874.8±3.3 p=0.01	319.7±1.2 p=0.1	2.7	1194.5±14.0 p<0.000

* Мфиф—монофосфонизитфосфатиды

Таблица 2. Изменение различных фракции ФЛ (γ Р в/мл) в крови белых крыс под действием дс-РНК

Время введения препарата, мин	Лфх	Мфиф	Сфм	ФХ	ФС	ФЭ	Сумма Нфл	Сумма Кфл	К $\frac{Нфл}{Кфл}$	Сумма
Контроль	4.0±0.09	3.7±0.06	13.1±0.06	54.4±0.08	3.4±0.06	4.2±0.06	75.7±0.07	7.1±0.03	10.7	82.8
дс-РНК 15	6.26±0.43 p<0.001	4.89±0.23 p<0.001	5.46±0.6 p<0.001	17.58±2.4 p<0.01	4.89±1.0 p=0.05	4.19±0.35 p=0.5	33.4±0.09 p=0.001	9.80±0.03 p<0.001	3.4±0.03 p<0.001	43.20±5.3 p<0.001
дс-РНК 30	7.10±0.16 p<0.001	4.86±0.16 p<0.001	4.19±0.23 p=0.002	9.42±1.45 p<0.001	3.67±0.2 p=0.1	3.35±0.1 p>0.001	24.06±0.1 p<0.002	8.53±0.05 p=0.05	2.8±0.02 p=0.05	32.59±3.1 p<0.002

нимающих участие в катализе реакций трансмембранного переноса веществ, и расстройством физико-химических свойств мембранных образований в целом [1, 2]. Примечательно наиболее резкое снижение содержания фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) приблизительно на 32,5 и 46,0% соответственно. При этом столь же чувствительных отклонений в количественном содержании фосфатидилсеринов (ФС) не обнаружено, что мы склонны объяснить компенсаторным пополнением уровня этих липидов за счет ФХ и ФЭ, с легкостью превращающихся в ФС. Значение последних в конкретных условиях, по-видимому, достаточно велико и, следовательно, невторостепенна относительная стабильность уровня этих соединений в данной биологической системе.

Результаты наблюдений позволили установить, что отмеченные количественные изменения индивидуальных ФЛ сопровождаются уменьшением коэффициента отношения суммы нейтральных ФЛ (НФЛ) к сумме кислых ФЛ (КФЛ) примерно на 22,0%; снижение же содержания суммарных ФЛ, составившее приблизительно 30,0%, наиболее отчетливо выражено спустя 30 мин после введения препарата.

Отмеченные нами количественные изменения ФЛ мозговой ткани не позволили, однако, проследить какой-либо адекватности в динамике образования ЛФХ, не выявляемых, как известно, даже в нормально функционирующем мозге. Вместе с тем эта категория ФЛ заслуживает пристального внимания, особенно в экстремальных условиях функционирования организма, в частности, в свете современных представлений о роли этих соединений в возникновении, становлении и формировании повышенного фона иммунологической резистентности организма. В этой связи в данном конкретном случае интерес к особенностям картины количественных изменений ЛФХ был обусловлен главным образом ролью этих липидов в обеспечении эффекта неспецифической иммунорезистентности организма на фоне введения дс-РНК.

Исходя из вышесказанного, мы нашли логичным различать печатные исследования в направлении изучения закономерностей и количественных изменений всего спектра ФЛ в цельной крови с особым акцентом на сдвиги содержания ЛФХ, выявляемых здесь с легкостью и отличием от мозговой ткани даже в условиях нормально метаболизирующего организма.

Как явствует из табл. 2, спустя 15 и особенно 30 мин после введения дс-РНК в цельной крови заметно возрастает количество ЛФХ, составляющее приблизительно 55,0 и 77,5% соответственно. Уровень остальных фракций ФЛ как в мозге, так и в цельной крови претерпевает обратный сдвиг. Примечательно, что, как и в мозговой ткани, в цельной крови количество ФС спустя 15 мин после введения дс-РНК возрастает приблизительно на 44,0%. Этот факт, неоднократно констатированный в отношении обеих исследованных систем, является логичным подтверждением высказанного нами предположения о важном метаболическом значении ФС, в частности, в плане их участия в формировании защитной реакции организма, по всей вероятности, совместно с ЛФХ. Од-

нако наши доводы в пользу отмеченной физиологической роли ФС нуждаются в дальнейшем обстоятельном изучении и подтверждении.

Приведенные нами данные о повышенном выходе ЛФх в цельной крови при введении дс-РНК наводят на мысль об активировании при этом также фосфолипазы A_2 , сопровождающемся одновременным выходом значительного количества НЭЖК. И ЛФх, и НЭЖК, выступая в роли поверхностно-активных соединений, при чрезмерно высоких концентрациях проявляют выраженное мембранотоксическое действие, сопровождающееся дестабилизацией барьерной функции клетки и извращением процессов трансмембранного переноса веществ. Поэтому вполне понятно сомнение относительно возможности получения стимулирующего эффекта от малых концентраций ЛФх на активность мембраносвязанных ферментов. Речь идет о таких количествах липида, которые не способны оказывать повреждающего действия на жизнеспособность биологических мембран и клетки в целом.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что сдвиги в количественном наборе индивидуальных ФЛ в общем спектре этих соединений в цельной крови намного выраженнее таковых в мозговой ткани.

На основании полученных результатов пока трудно интерпретировать механизмы описанных метаболических отклонений, однако остается бесспорным, что головной мозг, являясь системой с исключительно высоким знаком дифференциации, обладает также мощными механизмами защиты, обеспечивающими, в частности, исключительно совершенный потенциал резистентности, четко проявляющийся даже при разрушительном действии сверхсмертельных доз ионизирующей радиации. Кровь же, наоборот, реагируя достаточно быстро и адекватно даже на весьма незначительные по силе своего воздействия раздражающие агенты внешней среды, является также зеркальным отражением всего того многокомпонентного комплекса метаболических расстройств, которые развиваются в различных органах и системах организма и ответ на гамму всевозможных функциональных, экстремальных и патологических отклонений.

Об активировании фосфолипазы A_2 под воздействием дс-РНК свидетельствует факт резкого уменьшения суммы всех ФЛ, составляющих примерно 61,0% от уровня указанных соединений в цельной крови интактных животных. Отмеченный сдвиг обеспечивается главным образом за счет убыли содержания основных фракций ФЛ—ФХ и СФМ (сфингомиелины), количество которых через 30 мин после введения препарата уменьшается приблизительно на 83,0 и 68,0% соответственно. Являясь представителями НФЛ, они обуславливают существенный сдвиг в величине Нфл/Кфл. Поскольку содержание первых из них через 15—30 мин после введения препарата снижается примерно на 56 и 68,0% соответственно, а вторых на 38,0 и 20,0%, то в результате такого изменения соотношений ФЛ—ФХ имеет место заметное уменьшение величины указанного Нфл/Кфл с 10,7 до 2,8, т. е. примерно на 84,0%.

Таким образом, можно заключить, что эффекты дс-РНК сопровождаются существенным повышением активности фосфолипазы A_2 как в

мозговой ткани, так и в цельной крови. Это подтверждается значительным снижением в изученных биологических средах уровня подавляющего большинства ФЛ, приводящим, как отмечалось, к расстройствам филогенетически стабилизированного постоянства липид-липидных соотношений с вытекающими отсюда нарушениями функциональной активности мембранных протеинов. Наконец, описанные сдвиги характеризуются отчетливым увеличением в цельной крови содержания Лфх играющих, по современным представлениям, важную адьювантную роль в формировании иммунорезистентной реакции организма. Полученные нами данные (в печати) об образовании в мозговой ткани интерферона в ответ на введение Са-де-РНК, с одной стороны, а также выражаемая картина активации фосфолипазы A_2 — с другой, на фоне отчетливого снижения содержания ФЛ являются косвенными, но убедительными показателями деацилирования этих липидов с выходом Лфх в мозговую ткань. Возможно, образование последних происходит в значительных концентрациях. Однако, учитывая функционально-метаболические особенности мозговой ткани, нетрудно понять реальность быстрого вовлечения даже значительных количеств Лфх в различные процессы обмена вещества в этом органе, поскольку Лфх обладает высокой степенью обменяемости и, следовательно, практически исключается возможность их выявления и тем более количественного определения. В числе отмеченных метаболических процессов, характеризующихся активным участием Лфх, значение реакций формирования антителообразовательной функции организма, по всей вероятности, трудно переоценить.

На современном этапе изучения функциональной роли ФЛ в обеспечении физиологической активности клетки, в частности, ее иммунологических свойств, выявление специфических особенностей обмена диацилированных и лизоформ этих соединений при мобилизации иммунологической реакции организма приобретает особое значение, акцентирующее, в частности, мембранную природу антителообразующей функции организма, которая требует к себе пристального внимания в плане обстоятельного изучения ее молекулярно-биологических механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. В., Джомялова М. И. В кн.: Биогенноокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. 156—179, М., 1981.
2. Бурлакова Е. В., Джомялова М. И. В кн.: Биогенноокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. 113—141, М., 1981.
3. Захарян Р. А., Месробян Н. П., Монсеян А. В., Асикалян А. С., Акопян Ж. И. Экспериментальная онкология, 7, 3, 54—56, 1985.
4. Захарян Р. А. Генетические и негенетические эффекты экзогенных нуклеиновых кислот. Тез. репл. конф., Ереван, 1986.
5. Карагемян К. Г. Лаб. дело, 1, 23—26, 1969.
6. Крекс Е. М. В кн.: XXII Баховские чтения, 74, Л., 1967.
7. Крекс Е. М. Липиды клеточных мембран. 340, Л., 1981.
8. Ferrel P. G., Sen G. C., Dubois M. F., Ratner C., Langue I. P. *Fros. Natl. Acad. Sci USA*, 75, 893—897, 1978.
9. Folch J., Lees M. J. *Biol. Chem.*, 226, 497, 1957.

10. *Graham F. L., Vander Eb. A. Virology, 52, 456—461, 1973.*
11. *Han I. H., Johnson A. G. Immunol, 117, 423—427, 1976.*
12. *Kronenberg L., Humphreys T. Biochemistry, 11, 2020—2026, 1976.*
13. *Marinetti A. V., Stoltz E. Biochim. Biophys. Acta, 21, 168—170, 1956.*
14. *Mathe G., Florentin L., Olsson L., Bruely—Rossat M., Schullz L., Kriger M., Wassal F. Cancer Treat. Rep., 62, 1613—1621, 1978.*
15. *Rutner L., Wiegand R. C., Farrel P. G., Sen G. C., Garber B., Lengyel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 947—962, 1978.*

Поступило 13.X 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 12, 985—990, 1987

УДК 665.2.577:425.591.11

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНОВ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИВОТНЫХ ЖИРОВ НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН КРОВИ КРЫС

Г. А. ЧУХАДЖЯН, О. П. СОЦКИИ, К. М. КОЧАРЯН, Г. А. ОВЕЯН,
Г. М. САРКИСОВА, А. Х. МАШИНЯН, Н. А. БАКАЛЯН, Г. А. АБРААМЯН,
Л. В. СУКНАСЯН, А. Х. КАЛАШЯН

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра биохимической и биофизической химии

Исследовалось влияние пищевых рационов с повышенным содержанием животных жиров—курдючного, лярда и говяжьего—на некоторые показатели липидного обмена крови крыс. Выявлены различия в сдвигах этих показателей в крови в зависимости от природы использованных жиров.

Հետազոտված է կենդանական՝ դմակի, խոզի, տավարի ճարպերի ցարձք պարունակությամբ կերային օրգանիզմների ազդեցությունը անևտենների արյան լիպիդային փոխանակության որոշ ցուցանիշների վրա: Ցույց է տրված արյան ձև այդ ցուցանիշների շարժը՝ կախված օգտագործված ճարպերի հազեցվածությամբ աստիճանից:

The influence of food ration with increased content of animal fats—fat tail, lard and beef—on some indices of lipid metabolism in the blood of rats is investigated. The different quantities of these indices in the blood, depending on the degree of saturation of used fats is shown in the report.

Ключевые слова: животные жиры, липиды, кровь.

Необходимость данного исследования диктуется значительным ростом жиров животного происхождения в пище населения экономически развитых стран, составляющих приблизительно 40 и более процентов энергетической ценности рациона. Этот факт привлекает внимание органов здравоохранения, так как в настоящее время очевидна роль повышенного потребления животных жиров и углеводов в генезе атеросклероза [15].

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка влияния изокалорийных рационов с повышенным содержанием животных жиров, различающихся степенью атерогенности и насыщенности входящих в их состав жирных кислот, на некоторые стороны липидного обмена крови экспериментальных животных.