

БИОХИМИЯ

УДК 661.247-771.74

Академик К. Г. Карагезян, М. Д. Сафарян, Д. А. Арутюнян, С. С. Овакимян

Особенности структурно-функциональных и количественных
нарушений фосфолипидов в механизмах формирования
гипоксического синдрома при туберкулезном воспалении легочной
ткани в эксперименте

(Представлено 21/IV 2008)

Ключевые слова: гипоксический синдром, туберкулез, фосфолипиды, мембраны эритроцитов, легочная ткань

Проблема выявления патобиохимических механизмов этиологии воспалительных процессов по сей день остается одной из неразрешенных задач современной фундаментальной и прикладной медицины. Это преимущественно касается легочной ткани, которая в отличие от мозговой продолжает оставаться недостаточно исследованной. главным образом, в плане изучения химии и биохимии липидного компонента клеточных мембран как факторов, обеспечивающих структурно-функциональные особенности главных элементов клетки [1-4].

Филогенетически стабилизированный в норме качественный состав и количественное содержание фосфолипидов (ФЛ) биологических мембран [5] служит основой в регуляции и поддержании ФЛ-ФЛ соотношений в них, а также в сохранении строго лимитированного уровня интенсивности течения реакций свободнорадикального окисления (СРО) липидов как необходимого условия обеспечения норм клеточной активности в физиологически и патологически метаболизирующем организме.

Настоящее исследование посвящено оценке качественно-количественных нарушений и особенностей расстройств ФЛ-ФЛ соотношений в легочной ткани, пораженной туберкулезным воспалением [6, 7], а также в мембранах

эритроцитов (МЭ) и лимфоцитов (МЛ) селезенки морских свинок с моделированным у них туберкулезным поражением легочной ткани. Подобная постановка вопроса, ставшая предметом специальных исследований, предполагала получение принципиально новой научной информации, проливающей в известной степени свет на современное понимание молекулярных механизмов патогенеза деструкционных процессов в отмеченных объектах исследования при изученной патологии, отличающейся развитием ярко выраженного стойкого гипоксического синдрома (ГС).

Включение МЭ и МЛ в круг выполненного исследования было продиктовано укоренившимся в настоящее время в научной литературе мнением об универсальности МЭ, отражающих в целом структурно-функциональные и метаболические особенности всех мембранных образований тканевых систем независимо от их филогенетической дифференцированности. Вместе с тем МЭ и особенно МЛ отводится специальная роль в инициации, формировании и стабилизации иммунологических процессов [8-11]. Вышеотмеченное возбуждает живой интерес к проведению широкомасштабных исследований в направлении изучения и выявления особенностей качественно-количественных сдвигов ФЛ как основных структурно-функциональных компонентов живых мембран в норме и особенно при экстремальных состояниях организма, в том числе его туберкулезном поражении.

Исследования проводили на 36-и морских свинках 2-месячного возраста массой 250-300 г, зараженных культурой МБТ штамма Н₃₇ в дозе 0.0001 мг путем подкожной инъекции в паховую область. Эвтаназию животных производили спустя 30 дней под легким гексаналовым наркозом. Изоляцию легких их гомогенизацию и получение ацетоновых порошков осуществляли в среде (0.27 М сахарозы и 0.1 мМ ЭДТА (1:1). Получение ацетоновых порошков легочной ткани осуществляли по методике Карагезяна [12], мембран эритроцитов – по Либеру [13], экстрактов ФЛ – по Фолчу [14], их индивидуальных фракций – методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием системы растворителей – хлороформ-метанол-аммиак в объемных соотношениях 65:35:5. Лимфоциты селезенки отделяли центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фико-400 – верэграфин 12 и инкубировали в количестве 10⁷ мл при 37°С в 0.01 М растворе трис-НСl буфера с рН 7.4 в смеси со средой 199 (в соотношении 1:4) в присутствии митогена конканавалина А (6 мкг/мл). МЛ, освобожденные после осмотического шока, осаждали повторным центрифугированием с использованием их на предмет определения содержания ФЛ [14].

Согласно полученным результатам нейтральная категория ФЛ (НФЛ) легочной ткани представлена сфингомиелинами (СФМ), фосфатидилхолина-

ми (ФХ) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ); кислые же ФЛ (КФЛ) представлены монофосфоинозитами (МФИ), фосфотидилсеринами (ФС), фосфатидными кислотами (ФК) и кардиолипинами. Аналогичный спектр ФЛ обнаруживается как в МЭ, так и в МЛ, где проявляются и лизофосфатидилолины (ЛФХ), отсутствующие в нормально метаболизирующей легочной ткани, несмотря на общность ее по своему эктодермальному происхождению с мозговой тканью, богатой ЛФХ.

Таблица 1

Качественно-количественные изменения фосфолипидов в мкг липидного фосфора/г ацетонового порошка легочной ткани морской свинки в норме (контроль) и при ее туберкулезном воспалении

Показатели	Контроль	% от СФЛ	Больные	% разницы от контроля	% от СФЛ
Лизофосфатидилолины	-	5.5	141.5 ± 1.9	-	8.3
Монофосфоинозитиды	129.3 ± 2.1	15.3	245.8 ± 2.1	+90.1	14.8
Сфингомиелины	363.3 ± 2.8	47.1	249.5 ± 1.8	-31.3	26.5
Фосфатидилолины	1116.0 ± 3.9	20.8	450.5 ± 2.1	-59.6	13.2
Фосфатидилэтаноламины	492.9 ± 2.8	7.6	225.3 ± 2.3	-54.3	14.2
Фосфатидилсерины	180.6 ± 2.3	1.5	241.5 ± 2.1	+33.8	3.5
Фосфатидные кислоты	33.9 ± 1.1	2.3	60.9 ± 2.0	+79.7	4.7
Кардиолипины	53.7 ± 1.3	83.2	81.9 ± 1.1	+52.5	62.9
Сумма НФЛ (СНФЛ)	1972.2 ± 2.1	16.8	1066.8 ± 2.3	-45.9	37.1
Сумма КФЛ (СКФЛ)	397.5 ± 2.1	-	630.1 ± 2.1	+58.5	-
Сумма всех ФЛ (СФЛ)	2369.7 ± 2.9	-	1696.9 ± 2.3	-38.4	-
К СНФЛ/СКФЛ	4.96	-	1.69	-65.9	-

Примечания. N(контроль) = 36; больные = 36; отклонения в величине показателей индивидуальных фракций ФЛ, СНФЛ, СКФЛ, СФЛ, а также К СНФЛ/СКФЛ статистически достоверны, величины P колеблются в пределах 0.001-0.01.

Как явствует из результатов проведенных исследований, отраженных в табл. 1-3, в пораженной туберкулезным воспалением легочной ткани, МЭ и МЛ селезенки морских свинок бросается в глаза статистически достоверное нарушение филогенетически стабилизированного баланса между количественным содержанием индивидуальных представителей ФЛ [5], обуславливающее расстройство в картине ФЛ-ФЛ соотношений исследованных

биологических систем организма. В основе отмеченных отклонений фигурируют патологически развиваемые межфракционные взаимопревращения ФЛ, в известной степени вызываемые неминуемым сильно выраженным повышением активности фосфолипазы А₂.

Благодаря последнему в патологически измененной легочной ткани обнаруживается заметное количество ЛФХ, а в МЭ и особенно в МЛ проявляется многократное возрастание их содержания. Повышенный катализ реакций деацилирования ФЛ-глицеридов, преимущественно ФХ, сопровождается уменьшением их уровня как в легочной ткани, так и в МЭ и МЛ.

Таблица 2

Качественно-количественные изменения фосфолипидов в мкг липидного фосфора / г ацетоновых порошков мембран эритроцитов крови морской свинки в норме (контроль) и на 30-й день моделирования туберкулезного воспаления легких

Показатели	Контроль	% от СФЛ	Больные	% разницы от контроля	% от СФЛ
Лизофосфатидилхолины	17.2 ± 0.6	7.2	86.4 ± 0.7	+ 402.3	28.2
Монофосфоинозитиды	32.4 ± 0.9	13.5	80.3 ± 0.9	+ 147.8	26.2
Сфингомиелины	19.8 ± 1.0	8.3	11.6 ± 0.8	- 41.5	3.8
Фосфатидилхолины	86.7 ± 1.0	36.2	49.9 ± 0.9	- 42.5	16.8
Фосфадитилэтанолламины	38.8 ± 0.9	16.2	18.8 ± 0.8	- 51.6	6.2
Фосфатидилсерины	16.9 ± 0.9	7.1	9.9 ± 0.9	- 41.4	3.2
Фосфатидные кислоты	11.1 ± 0.8	4.6	19.3 ± 0.8	+ 73.9	6.4
Кардиолипины	16.7 ± 0.7	7.0	29.9 ± 0.8	+ 79.1	9.8
Сумма НФЛ (СНФЛ)	167.9 ± 1.0	67.8	166.7 ± 1.1	- 2.6	54.5
Сумма КФЛ (СКФЛ)	77.1 ± 0.9	32.2	139.4 ± 0.9	+ 80.8	45.5
Сумма всех ФЛ (СФЛ)	239.6 ± 1.2	-	306.1 ± 1.2	+ 27.8	-
К СНФЛ/СКФЛ	2.11	-	1.21	- 42.7	-

Примечания. Показатели те же, что и в табл. 1.

Вышеизложенное мы склонны интерпретировать как частное проявление ответной реакции организма на гамму болезненных сигналов, поступающих из очага воспаления, с приобщением ряда химических и физических факторов, возможно и биологически активных соединений, выступающих в роли адаптогенов и иммунитетстимулирующих агентов [1]. Что касается возможных механизмов образования ЛФХ, отсутствующих в легочной ткани

в физиологических условиях и появляющихся в ней в условиях изученной патологии, то в связи с этим возможны определенно приемлемые толкования. Наиболее реальным, на наш взгляд, представляется помимо деацилирования ФХ также подключение синтеза этой категории липидов через альтернативные пути их образования. Основным из них можно считать процесс реацилирования глицерил-фосфорилхолина при активном участии различных насыщенных жирных кислот, приводящий к образованию ЛФХ как необходимых факторов в стимуляции определенных этапов иммуномоделирующей активности организма. Полученные результаты свидетельствуют об участии ЛФХ в реализации определенных компенсаторно-приспособительных реакций организма, чрезвычайно необходимых в условиях патологии и в частности при изучаемом болезненном состоянии организма. Эти данные весьма адекватны решениям отчетного собрания Нью-Йоркской академии наук 2000 года, посвященным анализу роли лизо-ФЛ, в том числе и ЛФХ в биологии и патологической физиологии [15].

Таблица 3

Качественно-количественные изменения фосфолипидов в мкг липидного фосфора / г ацетоновых порошков мембран лимфоцитов крови морской свинки в норме (контроль) и на 30-й день моделирования туберкулезного воспаления легких

Показатели	Контроль	% от СФЛ	Больные	% разницы от контроля	% от СФЛ
Лизофосфатидилхолины	14.7 ± 0.8	6.3	99.3 ± 0.9	+ 574.7	31.5
Монофосфоинозитиды	25.8 ± 1.1	10.0	39.0 ± 1.2	+ 52.0	12.4
Сфингомиелины	23.7 ± 1.1	9.2	10.5 ± 1.1	- 44.3	3.3
Фосфатидилхолины	83.5 ± 1.0	32.3	29.7 ± 1.1	- 64.6	9.4
Фосфатидилэтаноламины	45.7 ± 1.0	13.8	25.3 ± 1.1	- 44.6	8.1
Фосфатидилсерины	41.3 ± 1.1	16.0	60.5 ± 1.1	+ 46.5	19.2
Фосфатидные кислоты	9.3 ± 0.9	3.6	24.5 ± 1.0	+ 163.5	7.8
Кардиолипины	14.9 ± 0.9	5.8	26.5 ± 0.6	+ 77.9	8.3
Сумма НФЛ (СНФЛ)	167.6 ± 1.1	64.7	164.8 ± 1.2	- 1.6	52.3
Сумма КФЛ (СКФЛ)	91.3 ± 0.9	35.3	150.5 ± 1.0	+ 64.8	47.7
Сумма всех ФЛ (СФЛ)	258.9 ± 0.9	-	315.3 ± 1.2	+ 21.8	-
К СНФЛ/СКФЛ	1.84	-	1.11	- 40.2	-

Примечания. Показатели те же, что и в табл. 1.

Особый интерес представляет понижение величины коэффициента (К) отношения суммы НФЛ к сумме КФЛ (К СНФЛ/СКФЛ), обусловленное возрастанием "удельного веса" КФЛ в сумме всех ФЛ (СФЛ) как соединений, наделенных высоким потенциалом функциональной активности, в частности в реакциях респираторной функции митохондрий, где они выступают в роли мощных активаторов дыхательного процесса. Итак, совершенно очевидно участие КФЛ в процессах репарации разрушенных воспалительным процессом структурных образований легочной ткани.

Научно-технологический центр органической
и фармацевтической химии НАН РА

Академик К. Г. Карагезян, М. Д. Сафарян, Д. А. Арутюнян, С. С. Овакимян

**Особенности структурно-функциональных и количественных нарушений
фосфолипидов в механизмах формирования гипоксического синдрома при
туберкулезном воспалении легочной ткани в эксперименте**

Экспериментальное туберкулезное воспаление легочной ткани у морских свинок характеризуется развитием в последней, а также в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови ярко выраженного нарушения качественно-количественного состава фосфолипидов нейтральной и кислой природы. В легочной ткани, пораженной туберкулезным воспалением, отмечается чувствительное падение уровня фосфолипидов-глицеридов, преимущественно фосфатидилхолинов, сопровождающееся возникновением высоких концентраций лизофосфатидилхолинов, отсутствующих в нормально метаболизирующей легочной ткани даже в следовых количествах. Отмеченные сдвиги характеризуются одновременно проявляющимся возрастанием содержания кислых фосфолипидов. Последнее свидетельствует о важной роли этой категории фосфолипидов в активировании репарационных процессов в пораженном органе. Следует заметить весьма отрицательное мембранотоксическое мембранолитическое действие высоких концентраций лизопроизводных фосфолипидов на физиологическую активность нормально функционирующих биологических систем организма. В то же время умеренно высоким концентрациям лизофосфатидилхолинов, статистически достоверно доминирующим над верхними границами нормы, придается по современным воззрениям существенное значение в повышении иммунологической активности организма в целом.

Ալադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան, Մ. Դ. Սաֆարյան, Դ. Ա. Հարությունյան,
Ս. Ս. Նովակիմյան

Ֆոսֆոլիպիդների կառուցվածքաֆունկցիոնալ և քանակական խախտումների առանձնահատկությունները հիպոքսիկ սինդրոմի ձեւավորման մեխանիզմում թոքային հյուսվածքի փորձարարական փուլերկուլյոզային բորբոքման պայմաններում

Ծովախոզուկների թոքերի փորձարարական փուլերկուլյոզի պայմաններում թոքային հյուսվածքում, ինչպես նաեւ էրիթրոցիտների եւ լիմֆոցիտների թաղանթներում հայտնաբերվում են լառ արտահայտված որակաքանակական խանգարումներ չեզոք եւ թթու ֆոսֆոլիպիդների կազմում: Թոքային հյուսվածքում արձանագրվում են գլիցերիդային ֆոսֆոլիպիդների, գլխավորապես ֆոսֆատիդիլխոլինների, քանակի անկում, որը գուցե որովայն է լիզոֆոսֆատիդիլ իոլինների առաջացմամբ, մի բան, որ չի նկատվում նորմալ թոքային հյուսվածքում: Դրան գուցե հետ փոքի է ունենում թթու ֆոսֆոլիպիդների քանակի ավելացում, որը վկայում է ռեպարացիոն պրոցեսների մեջ նշված նյութերի կարելիություն մասին: Հարկանշական է լիզոաձսանցյալների բարձր քանակների թաղանթափոքիկ եւ թաղանթալիփիկ բացասական ազդեցությունը կենդանի բջիջների ֆիզիոլոգիական ակտիվության վրա: Միեւնույն ժամանակ նշված է նյութերի միջին սահմաններում նորման գերազանցող քանակների կարելիությունը օրգանիզմի ընդհանուր իմունոլոգիական ակտիվությունն ապահովելու գործում: Նշված հարցի կարելիությունը կդառնա հետագա հարուկ ուսումնասիրությունների առարկա:

Academician K. G. Karageuzyan, M. D. Safaryan, D. A. Harutyunyan, S. S. Hovakimyan

Peculiarities of Structural-Functional and Quantitative Disorders of Phospholipids in Mechanisms of Formation of Hypoxic Syndrome under the Conditions of Lung Tissue Experimental Tuberculosis Inflammation

The obtained results have shown that experimental tuberculosis in guinea pigs is characterized by significant changes in phospholipid metabolism both in lung tissue and in erythrocytes, lymphocytes membrans. The disorders mentioned were conditioned by decrease of quantity of neutral phospholipids in systems studied, while the level of acidic phospholipids was increased. This fact permits us to conclude that acidic phospholipids play the role of factors participating in reparation processes of lung tissue have been affected by tuberculosis inflammation. We adopt this idea because it is well known that this compounds and especially phosphatidylserines, phosphatidic acids as well as cardiolipines participate in respiratory reactions of mitochondria, the process which is very important in mobilization of recovery processes and activation of the compensatory-adaptation reactions of the pathologically changed biological systems of the organism. Appearing of lysophosphatidylcholines in lung tissue affected by tuberculosis process lead us to the conclusion about the membranotoxic and membranolytic properties of these compounds

in high concentrations. At the same time it is well known about the immunestimulatory role of them in the stable, but not in so high quantity level of substances studied.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. - Вестник РАН. 1994. Т. 64. N5. С. 425-431.
2. Карагезян К.Г. В кн: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван. Айастан. 1972. 267 с.
3. Карагезян К.Г., Погосян А.Ю., Овсепян Л.М. - Докл. РАН. 1994. Т. 334. N1.
4. Пепоян А.З., Кцоян Ж.А., Шагинян А.А., Овсепян Л.М., Карагезян К.Г. - Биофизика. 1991. Т. 36. N3. С. 475-479.
5. Крепс Е.М. - В кн: Липиды клеточных мембран. Л. Наука. 1981. 330 с.
6. Карагезян К.Г., Сафарян М.Д. - Пробл. туб. 1990. N8. С. 22-24.
7. Сафарян М.Д., Карагезян К.Г. - Клин.мед. 1991. N7. С. 31-33.
8. Бергельсон Л.Д., Дятловидская Э.В. - Итоги науки и техники. Серия "Иммунология", М. ВИНТИ. 1988. Т. 22. С. 6-21.
9. Дятловидская Э.В. - Биохимия. 1991. Т. 56. N4. С. 560-564.
10. Дятловидская Э.В. - Биохимия. 1995. Т. 60. N6. С. 843-850.
11. Дятловидская Э.В., Андреасян Г.О., Малых Я.Н., Рылов С.Н. - Биохимия. 1997. Т. 62. С. 651-656.
12. Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Карапетян Э.Т. - Вопр.мед.химии. 1989. N4. С. 11-12.
13. Limber G.R., Davis R.F. - Blood. 1970. V. 36. P. 111-118.
14. Folch J., Lees M., Sloan-Stenley G.H. - J.Biol.Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.
15. Goetzi E.J., Lynch K.R. - Annals of the New-York Academy of Sciences. 2002. V. 905. P. 357.