

БИОХИМИЯ

УДК 661.247-771.74 + 612.111 + 612.42 + 616.24-002.5 + 591.39

Академик К. Г. Карагезян¹, М. Д. Сафарян², С. С. Овакимян¹,
Д. А. Арутюнян²

**Сравнительная оценка глубины метаболических нарушений
фосфолипидов в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови в
различные периоды развития острого туберкулезного воспаления
легких в эксперименте и действие препарата "зетапол" на этом фоне**

(Представлено 15/VII 2009)

Ключевые слова: *фосфолипиды, мембраны эритроцитов, мембраны лимфо-
цитов, туберкулез, лизофосфатидилхолины, кальциевый преципитат дрожжевой
низкомолекулярной двуспиральной РНК*

Необходимость разработки принципиально новых подходов по изыска-
нию современных, более совершенных и результативных средств антитуберкулезного действия является проблемой первостепенной важности. В подобной постановке вопроса следует отметить развиваемую в последнее время концепцию профессора Е.Б.Бурлаковой об исключительно высокой терапевтической эффективности сверхмалых доз факторов химической природы, в том числе физиологически активных соединений и лекарственных препаратов, колеблющихся в пределах более чем 10^{-18} М, а также физических факторов сверхнизкой интенсивности [1].

Особого внимания заслуживает препарат под кодовым названием "зетапол", являющийся кальциевым преципитатом дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (Ca^{2+} -дс-РНК). Имеются многочисленные исследования по выявлению и изучению в деталях особенностей физико-химических свойств этого весьма яркого физиологически активного соединения, его уникальных антивирусных, антибактериальных, репарационных, противораковых, интерферониндуцирующих, гемопозактивирующих, антиотечных свойств [2-7]. Высокая степень противотуберкулезного действия

дс-РНК была продемонстрирована нами ранее на солидном по объемку клинико-экспериментальном материале с положительной оценкой Гос.ком. СССР по делам изобретений и открытий N206-КМ от 11.08.1986 г.; авторскими свидетельствами Гос.реестра СССР N1367197 от 15.09.1987 г. и N1374494 от 15.10.1987 г., N13462456, A61B17/00 1996 г.; патентом ВНИИ Гос.патентной экспертизы ВНИИГПЭ Гос.патентного ведомства СССР от 25.10.1990 г.; патентом N 1072 от 17.07.1998 г. Патентного управления РА и др.

Основная цель настоящего исследования состояла в выявлении эффективности действия Ca^{2+} -дс-РНК в сверхнизких концентрациях (10^{-12}M) на расстроенные звенья метаболизма фосфолипидов (ФЛ) в мембранах эритроцитов (МЭ) и лимфоцитов (МЛ) крови при остром туберкулезном поражении легочной ткани экспериментальных морских свинок.

Включение МЭ и МЛ в настоящее исследование было обусловлено укоренившимся в последнее время в научной литературе мнением об универсальности МЭ, отражающих в целом структурно-функциональные и метаболические особенности мембранных образований клеток различных уровней их филогенетической дифференциации. Вместе с тем МЭ и особенно МЛ отводится специальная роль в инициации, формировании и стабилизации иммунологических процессов [8-11]. Нами изучались особенности 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 25-и морских свинках двухмесячного возраста массой 250-300 г, зараженных культурой МБТ штамма Н₃₇ в дозе 0.0001 мг путем подкожной инъекции в паховую область. Кровь для исследования брали спустя 5, 10, 15 и 30 дней из дохвостовой вены шприцем. Получение ацетоновых порошков осуществляли в среде 0.27 М сахарозы и 0.1 мМ ЭДТА (1:1). МЭ выделяли по Лимберу [12]. Лимфоциты отделяли центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фикол-400 - верографин 12 и инкубировали в 10^7 мл в 0.01 М р-ра трис-НСl буфера при 37°C , pH 7.4 в смеси со средой 199 (в соотношении 1:4) в присутствии митогена конканавалина А (6 мкг/мл). МЛ, освобождавшиеся после осмотического шока, осаждали повторным центрифугированием с использованием их для количественного определения ФЛ [13].

Экстракцию ФЛ осуществляли по Фолчу [13] в модификации Карагезяна [14], фракционирование их индивидуальных представителей — методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием системы растворителей: хлороформ — метанол — аммиак в объемных

соотношениях 65:35:5.

Согласно полученным данным, нейтральная категория ФЛ (НФЛ) в МЭ и МЛ представлена сфингомиелинами (СФМ), фосфатидилхолинами (ФХ), лизофосфатидилхолинами (ЛФХ) и фосфатидилэтаноламинами (ФЭ), а кислая (КФЛ) — монофосфоинозитами (МФИ), фосфатидилсерином (ФС), фосфатидными кислотами (ФК) и кардиолипинами (КЛ).

По результатам проведенных исследований, приведенным в табл. 1 и 2, при туберкулезном воспалении легочной ткани в МЭ и МЛ крови морских свинок бросается в глаза статистически достоверное нарушение филогенетически стабилизированного постоянства в картине ФЛ-ФЛ соотношений изучаемых биологических систем организма.

В основе отмеченных отклонений фигурируют патологически развиваемые межфракционные взаимопревращения ФЛ, в известной степени вызываемые сильно выраженным многократным возрастанием в МЭ и МЛ содержания ЛФХ. Наиболее реальным, на наш взгляд, объяснением следует признать альтернативный механизм образования столь высоких концентраций ЛФХ. Наряду с известным путем деацилирования ФХ не исключено подключение и обратного пути — процесса реацилирования глицерил-фосфорил-холина при активном участии различных жирных кислот, приводящем к ресинтезу ЛФХ в достаточно высоких концентрациях. Последнее является необходимым условием для стимуляции определенных этапов компенсаторно-приспособительных реакций, чрезвычайно важных в реализации иммуномодулирующей активности организма, особенно в условиях патологии и в частности при изученном болезненном состоянии организма. Высказанные соображения созвучны современным суждениям о роли лизо-ФЛ, в том числе и ЛФХ, в биологии и патологической физиологии [15] и, как отмечалось, в основном касаются участия этих соединений в формировании механизмов стимуляции иммунологической активности организма. Одним из частных показателей падения последней при данном болезненном состоянии является и неоднократно наблюдавшееся резкое уменьшение содержания СФМ в исследованных мембранах как соединений, рассматриваемых в настоящее время в качестве факторов, причастных в определенной степени к механизмам становления, развития и стабилизации физиологического статуса организменного иммунитета [8-11].

Установленное нами ярко выраженное количественное возрастание КФЛ — ФС, ФК и КЛ в МЭ и МЛ является свидетельством мобилизованности компенсаторных механизмов, ответственных за максимальное поддержание резко подавленного энергетического потенциала на общеорганизменном уровне.

Таблица 1

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора / г ацетонового порошка) в МЭ крови морских свинок в контроле (к) и при моделированном у них туберкулезном воспалении легких на 5, 10, 15 и 30-й дни развития болезненного процесса

Показатели	к	ТБС 5-й день	% раз- ницы от к	ТБС 10-й день	% раз- ницы от к	ТБС 15-й день	% раз- ницы от к	ТБС 30-й день	% раз- ницы от к
ЛФХ	16.9±0.5	38.4±0.4*	+127.2	59.3±0.5*	+250.9	71.0±0.6*	+320.0	90.2±0.7*	+433.7
МФИ	29.3±0.7	48.3±0.5*	+ 64.8	55.7±0.6*	+90.0	67.1±0.6*	+129.0	73.4±0.7*	+150.5
СФМ	17.2±0.8	15.0±0.4**	- 13.0	12.8±0.4*	-25.6	10.0±0.5*	-42.0	7.9±0.5*	-54.0
ФХ	77.7±0.9	70.9±0.7*	-9.0	62.7±0.8*	-19.2	54.3±0.8*	-30.0	43.9±0.7*	-43.0
ФЭ	35.5±0.7	30.5±0.6*	-14.0	26.0±0.5*	-27.0	21.5±0.6*	-39.0	25.7±0.5*	-27.6
ФС	14.7±0.7	12.5±0.5**	-15.0	9.1±0.5*	-38.0	7.9±0.5*	-46.0	6.1±0.5*	-58.0
ФК	10.9±0.7	12.9±0.7***	+18.3	14.7±0.6*	+34.9	16.5±0.5*	+51.0	19.1±0.6*	+75.0
КЛ	15.7±0.6	18.1±0.7**	+15.3	21.3±0.7*	+35.7	24.4±0.6*	+55.4	27.7±0.7*	+76.4
С НФЛ	147.3±1.1	154.8±1.0*	+5.1	160.8±0.9*	+9.2	156.8±1.0*	+6.4	167.7±0.9*	+13.8
С КФЛ	70.6±0.9	91.8±0.9*	+30.0	100.8±0.9*	+42.8	115.9±0.8*	+64.2	126.3±0.8*	+78.9
С ФЛ	217.9±1.1	246.6±1.0*	+13.2	261.6±0.9*	+20.1	272.7±1.0*	+25.1	294.0±1.0*	+34.9
К С НФЛ / С КФЛ	2.1	1.7		1.6		1.4		1.3	

Примечания. n=25; пробы крови в объеме 1.0 мл брались у каждого животного до выработки у них болезненного процесса (контроль) и далее на каждой стадии его развития; * – $p < 0.01$; ** – $p < 0.1$; *** – $p > 0.5$

Таблица 2

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора / г ацетонового порошка) в МЛ крови морских свинок в контроле (к) и при моделированном у них туберкулезном воспалении легких на 5, 10, 15 и 30-й дни развития болезненного процесса

Показатели	к	ТБС 5-й день	% раз- ницы от к	ТБС 10-й день	% раз- ницы от к	ТБС 15-й день	% раз- ницы от к	ТБС 30-й день	% раз- ницы от к
ЛФХ	14.2±0.6	34.1±0.5*	+140.0	53.2±0.8*	+274.6	71.3±0.9*	+402.0	93.9±0.9*	+561.0
МФИ	24.9±0.8	30.9±0.8*	+24.1	37.0±0.8*	+48.6	43.3±0.9*	+73.9	50.1±0.9*	+101.2
СФМ	24.1±0.9	21.1±0.9*	-12.4	18.0±0.9*	-25.3	14.5±0.9*	-39.2	11.3±0.9*	-53.1
ФХ	76.9±1.0	65.5±0.9*	-14.8	55.3±1.0*	-28.1	45.4±1.0*	-41.0	35.2±1.0*	-54.2
ФЭ	43.9±0.8	39.5±0.8*	-10.0	35.3±0.8*	-19.6	31.1±0.8*	-29.2	27.1±0.8*	-38.3
ФС	40.3±0.9	45.3±0.9*	+12.4	50.1±0.9*	+24.3	54.7±0.9*	+35.7	59.5±0.8*	+47.6
ФК	9.9±0.8	13.8±0.8*	+39.4	17.7±0.8*	+78.8	21.6±0.8*	+118.2	25.5±0.8*	+157.6
КЛ	14.7±0.9	17.5±0.9***	+19.0	20.4±0.9*	+38.8	23.3±0.9*	+58.5	26.2±0.9*	+78.2
С НФЛ	159.1±1.0	160.2±1.0***	+0.7	161.8±1.0*	+1.7	162.3±1.0***	+2.0	167.5±1.0*	+5.3
С КФЛ	89.8±0.9	107.5±0.9*	+19.7	125.2±0.9*	+39.4	142.9±0.9*	+59.0	161.3±0.9*	+79.6
С ФЛ	248.9±1.1	267.7±0.9*	7.6	287.0±1.0*	+15.3	305.2±1.1*	+22.6	328.8±1.1*	+32.1
К С НФЛ / С КФЛ	1.8	1.5		1.3		1.1		1.0	

Примечания. n=25; пробы крови в объеме 1.0 мл брались у каждого животного до выработки у них болезненного процесса (контроль) и далее на каждой стадии его развития; * – $p < 0.01$; ** – $p < 0.1$; *** – $p > 0.5$

Таблица 3

Корректирующее действие сверхнизких концентраций (10^{-12} М) Ca^{2+} -дс-РНК на нарушенные стороны спектра фосфолипидов в МЭ морских свинок с 30-дневным острым экспериментальным туберкулезом легких

Показатели	к	ТБС 30-й день	% раз- ницы от к	ТБС Ca^{2+} -дс-РНК	% раз- ницы от к
ЛФХ	17.5 ± 0.6	$92.1 \pm 0.7^*$	+426.3	$32.9 \pm 0.5^*$	+88.0
МФИ	31.4 ± 0.7	$75.5 \pm 0.7^*$	+140.0	$35.1 \pm 0.6^*$	+12.0
СФ	19.3 ± 0.8	$10.0 \pm 0.5^*$	-48.2	$18.9 \pm 0.7^*$	-2.1
ФХ	79.8 ± 0.9	$46.0 \pm 0.7^*$	-42.4	$77.9 \pm 1.0^{***}$	-2.4
ФЭ	37.6 ± 0.7	$27.8 \pm 0.5^*$	-26.1	$34.9 \pm 0.7^{***}$	-7.2
ФС	16.8 ± 0.7	$8.2 \pm 0.5^*$	-51.2	$16.1 \pm 0.6^{***}$	-4.2
ФК	13.0 ± 0.7	$21.2 \pm 0.6^*$	+63.0	$12.2 \pm 0.7^{***}$	-6.2
КЛ	17.8 ± 0.6	$29.8 \pm 0.7^*$	+67.4	$16.9 \pm 0.6^{***}$	-5.1
С НФЛ	154.2 ± 1.0	$175.9 \pm 1.0^*$	+14.1	$164.6 \pm 1.0^*$	+6.7
С КФЛ	79.0 ± 0.8	$134.7 \pm 0.8^*$	+70.5	$80.3 \pm 0.8^{***}$	+1.6
С ФЛ	233.2 ± 1.1	$310.6 \pm 1.1^*$	+33.2	$244.9 \pm 1.0^*$	+5.0
К С НФЛ / С КФЛ	2.0	1.3		2.0	

Примечания. $n=30$ (по 10 животных в каждой опытной группе); введение раствора Ca^{2+} -дс-РНК в объеме 1 мл производилось ежедневно на протяжении 10 дней; обозначения достоверности полученных результатов те же, что и в табл. 1.

Таблица 4

Корректирующее действие сверхнизких концентраций (10^{-12} М) Ca^{2+} -дс-РНК на нарушенные стороны спектра фосфолипидов в МЛ морских свинок с 30-дневным острым экспериментальным туберкулезом легких

Показатели	к	ТБС 30-й день	% раз- ницы от к	ТБС Ca^{2+} -дс-РНК	% раз- ницы от к
ЛФХ	16.3 ± 0.6	$96.0 \pm 0.9^*$	+576.0	$30.9 \pm 0.6^*$	+89.6
МФИ	27.0 ± 0.8	$52.2 \pm 0.9^*$	+93.0	$25.3 \pm 0.8^{***}$	-6.3
СФМ	26.2 ± 0.9	$13.4 \pm 0.9^*$	-49.0	$25.9 \pm 0.9^{***}$	-1.1
ФХ	79.0 ± 1.0	$37.3 \pm 1.1^*$	-52.8	$77.3 \pm 1.1^{***}$	-2.2
ФЭ	46.0 ± 0.8	$29.2 \pm 0.8^*$	-36.5	$44.8 \pm 0.7^{***}$	-2.6
ФС	42.4 ± 0.9	$61.6 \pm 0.7^*$	+45.3	$40.3 \pm 0.9^{***}$	-5.0
ФК	12.0 ± 0.8	$27.6 \pm 0.8^*$	+130.0	$13.1 \pm 0.8^{***}$	+9.2
КЛ	16.8 ± 0.9	$28.3 \pm 0.8^*$	+68.5	$15.7 \pm 0.9^{***}$	-6.5
С НФЛ	167.5 ± 1.0	$175.9 \pm 1.0^*$	+5.0	$178.9 \pm 1.0^*$	+6.8
С КФЛ	98.2 ± 0.9	$169.7 \pm 0.9^*$	+72.8	$94.4 \pm 0.9^{**}$	-3.9
С ФЛ	265.7 ± 1.0	$345.6 \pm 1.0^*$	+30.0	$273.3 \pm 1.0^{***}$	+2.9
К С НФЛ / С КФЛ	1.7	1.0		1.9	

Примечания. $n=30$ (по 10 животных в каждой опытной группе); введение раствора Ca^{2+} -дс-РНК в объеме 1 мл производилось ежедневно на протяжении 10 дней; обозначения достоверности полученных результатов те же, что и в табл. 1.

Очевидно корректирующее действие Ca^{2+} -дс-РНК на расстроенные звенья метаболизма ФЛ (в табл. 3 и 4). Последнее выражается в восстановлении филогенетически стабилизированного постоянства качественно-количественного состава ФЛ различных категорий и ФЛ-ФЛ соотношений в биологических системах организма.

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 на клеточном уровне в роли мощных активаторов дыхательного процесса.

¹ Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА

² Республиканский противотуберкулезный диспансер МЗ РА

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

Сравнительная оценка глубины метаболических нарушений фосфолипидов в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови в различные периоды развития острого туберкулезного воспаления легких в эксперименте и действие препарата "зетапол" на этом фоне

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о глубине метаболических нарушений фосфолипидов, особенно лизофосфатидилхолинов, в мембранах эритроцитов и лимфоцитов крови морских свинок в различные периоды развития у них острого экспериментального туберкулеза легких.

Использование сверхнизких концентраций кальциевого преципитата дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной РНК (Ca^{2+} -дс-РНК) сопровождается нормализацией качественно-количественного состава фосфолипидов всех категорий за исключением лизофосфатидилхолинов, высокий уровень которых остается без изменений.

Ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան, Մ. Դ. Սաֆարյան, Ս. Ս. Նովակիմյան,
Դ. Ա. Նարությունյան

Ծովախոզուկների թոքերի փորձառական սուր փուլերկուլյոզի փարբեր փուլերում
արյան էրիթրոցիտների եւ լիմֆոցիտների թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդային
փոխանակության խանգարումների խորության համեմատությունը եւ «զեթապոլ»
նյութի ազդեցության առանձնահատկությունները այդ պայմաններում

Համաձայն ստացված արդյունքների, ակնհայտ է, որ ծովախոզուկների մոտ թոքերի
փորձառական սուր փուլերկուլյոզային գործընթացները բնորոշվում են արյան էրիթրոցիտ-
ների եւ լիմֆոցիտների թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդների եւ առավել եւս լիզոֆոսֆատիդիլխո-
լինների փոխանակության վառ արտահայտված խանգարումներով:

Խմորասնկային երկպարույր ցածրամուլեկուլային ՌՆԹ-ի կալցիումական ածանցյալի
զերցածր չափաբաժինների կիրառման պայմաններում արձանագրվում է ֆոսֆոլիպիդների
բոլոր ներկայացուցիչների փոխանակության կարգավորման փաստը բացառությամբ լիզոֆոս-
ֆատիդիլխոլինների, որանց բարձր քանակները հետազոտվող թաղանթներում շարունակում
են մնալ անփոփոխ:

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

Comparative Value of Phospholipids Metabolic Disorders in Erythrocyte and
Lymphocyte Membranes of Guinea Pigs in Different Periods of Experimental Acute
Tuberculosis of Lungs and Effects of "Zetapol" Preparation on this Background

The obtained data have shown that experimental tuberculosis of lungs of guinea pigs
is characterized by the significant abnormalities of phospholipids composition, especially
of lysophosphatidylcholines in blood erythrocyte and lymphocyte membranes.

Using of superlow concentrations of the Ca^{2+} -ds-RNA is accompanied by the nor-
malization of qualitative-quantitative disorders of all categories of phospholipids, except
lysophosphatidylcholines, the high level of which remained unchanged.

Литература

1. Бурлакова Е.Б. - Вестник РАН. 1994. Т. 64. N 5. С. 425-431.
2. Агабалян А.С., Давтян О.Я., Багдасарян А.А., Манукян Ж.В., Мартиросян
В.С., Рухкян Л.А., Захарян Р.А. - ДАН АрмССР. 1989. Т. 88. N 1. С. 31-34.
3. Агабалян А.С., Рухкян Л.А., Захарян Р.А. - ДАН АрмССР. 1989. Т. 88. N 2.
С. 93-96.
4. Агабалян А.С., Назаров Л.У., Базиян А.Р., Акопян Э.Б., Багдасарян А.А.,
Геворкян Г.А., Чухаджян Г.А., Захарян Р.А. - ДАН АрмССР. 1993. Т. 94. N 3. С. 173-177.

5. Агабалян А.С., Агавелян А.М., Давтян О.Я., Макарян А.П., Акопян А.С., Карагезян К.Г. - ДАН АрмССР. 1997. Т. 98. N 2. С. 166-169.
6. Агабалян А.С., Туманян М.А., Захарян Р.А. - ДАН АрмССР. 1998. Т. 98. N 4. С. 363-365.
7. Агабалян А.С., Агавелян А.М., Казарян А.В. В: Сб. научных трудов, посв. 70-летию ЕрГМУ. Ереван, 2000. С. 59-61.
8. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В. - Итоги науки и техники. Серия "Иммунология", М. ВИНТИ, 1988. Т. 22. С. 6-21.
9. Дятловицкая Э.В. - Биохимия. 1991. Т. 56. N 4. С. 560-564.
10. Дятловицкая Э.В. - Биохимия. 1995. Т. 60. N 6. С. 843-850.
11. Дятловицкая Э.В., Андреасян Г.О., Малых Я.Н., Рылов С.Н. - Биохимия. 1997. Т. 62. N 4. С. 651-656.
12. Limber G.R., Davie R.F., Haker A.M.S. - Blood. 1970. V. 36. N 2. P. 111-118.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stane G. - J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.
14. Карагезян К.Г. В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван. Айастан. 1972. 267 с.
15. Goetzl E.E.J., Lunch K.R. Lysophospholipids and Eicosanoids in Biology and Pathophysiology. Annals of the New-York Acad. of Sci. 2000. V. 905. 357 p.