

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616-006.445.616.08.577

**ВЛИЯНИЕ Ca^{2+} - дсРНК НА БИОСИНТЕЗ И ПЕРЕОКИСЛЕНИЕ
ЛИПИДОВ ПРИ ИОНИЗИРУЮЩЕМ ОБЛУЧЕНИИ**

П.А.Казарян, М.С.Вартанян, К.Г.Карагезян, А.А.Аветисян,
А.В.Саарян, К.И.Исраелян

*/Республиканский гематологический центр, Институт молекулярной
биологии НАН РА, Ереванский государственный университет/
375014 Ереван, ул. Нерсисяна, 7б*

Ключевые слова: липогенез, липолиз, переокисление липидов, фосфолипиды, двухспиральные РНК, ионизирующее облучение, печень, селезенка

В настоящее время установлено влияние экзогенных двухспиральных РНК (дсРНК) на клетки тканей животных. Показано, что экзогенные нуклеиновые кислоты способны существенно изменять метаболическую активность клеток, участвуя в стимуляции регенеративных процессов. При введении в организм они оказывают стимулирующее влияние на восстановительные процессы в органах и тканях [4]. Стимулирующий эффект экзогенных РНК на биосинтез белка реализуется преимущественно в гомологичных клетках-мишенях. Установлено усиление антибактериальной, антивирусной, противоопухолевой активности и стимуляция иммуногенеза препаратами РНК дрожжей и нуклеинатом натрия [5,8-10]. По данным некоторых исследователей [1,6], активным началом в препарате нуклеината натрия из дрожжей является содержащаяся в его составе дсРНК. Важным свойством дсРНК является стимуляция первичного и вторичного иммунного ответа на различные антигены. Противоопухолевый, противовирусный эффекты дсРНК реализуются через синтез интерферона. Предполагают, что дсРНК, являясь индуктором интерферона, заметно усиливает иммунный ответ Т- и В-системы клеток [5,15].

Литературные данные [7] свидетельствуют, что Са-формы полинуклеотидов (РНК дрожжей) оказывают достаточно выраженный митогенный эффект на фибробласты человека. Ca^{2+} -дсРНК повышает синтез ДНК в фибробластах на ранних стадиях размножения в культуре. В более поздних стадиях культивирования клеток дсРНК стимулирует про-

цесс терминальной дифференцировки, индуцируя синтез группы протеинов, характерных для постмитотической популяции фибробластов человека, претерпевающих процесс терминальной дифференцировки. Ca^{2+} -дсРНК оказывает стимулирующее влияние на транскрипцию генов *c-fos* и *c-jun* в фибробластах и HeLa-S-3 [7].

В основе действия Ca^{2+} -дсРНК лежат процессы, связанные с увеличением в клетке цАМФ, цГМФ и с активацией трансмембранных токов внеклеточного кальция, который в свою очередь приводит к перестройке метаболических процессов [6].

Перечисленные выше средства Ca^{2+} -дсРНК и результаты проведенных нами ранее исследований [12, 19, 20] по изучению мембранных аспектов патогенеза и терапии радиационного лейкоза явились основанием для исследования влияния Ca^{2+} -дсРНК на процессы липогенеза, липолиза и перекисления липидов при ионизирующем облучении.

Материал и методы

Исследования проводились на половозрелых крысах линии Вистар массой 160–180 г. Облучение проводили на аппарате РУМ-17 в дозе 3 Гр, мощность дозы — 0,26 Гр/мин, кожно-фокусное расстояние — 60 см.

Равномерно меченный ^{14}C -глицерин в количестве 300 мкК/кг массы вводили внутрибрюшинно с длительностью радиоактивной экспозиции 60 мин.

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов (ФЛ), моноацилглицеридов (МГ), диацилглицеридов (ДГ), триацилглицеридов (ТГ), фосфатидных кислот (ФК), жирных кислот (ЖК), холестерина (ХС) и эфиров холестерина (ЭХС) осуществляли с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии [16] в модификации П.А.Казаряна [11]. Включение *in vivo* радиоактивности в состав липидов измеряли на сцинтилляционном спектрометре SL-4221 фирмы "Intertechnique" (Франция) в сцинтилляторе Брея [17] после предварительной солюбилизации образцов в протозоле (фирма "New England Nuclear Corp.", США). Данные переводили в абсолютные единицы радиоактивности (в распады за 1 мин) методом внешней стандартизации и подвергали машинной обработке для получения окончательных результатов.

Активность перекисления липидов в мембранных структурах тканей определяли по реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой [14], а активность фосфолипазы A_2 — спектрофотометрическим методом [18].

Ca^{2+} -дсРНК в виде 0,1% водного раствора вводили внутрибрюшинно ежедневно (3 дня по одной инъекции в день) из расчета 5 мг/кг массы животного.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что через 10 дней после облучения крыс в дозе 3 Гр наблюдается существенное уменьшение включения *in vivo* ^{14}C -глицерина в состав фосфатидилинозитов (ФИ), сфингомиелинов (СФМ), фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) микросомальных мембран гепатоцитов (рис.1). На этом фоне резко увеличивается уровень радиоактивности ФК — промежуточных продуктов биосинтеза фосфатидов-глицеридов. Наблюдается значительное увеличение радиоактивности лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) — цитотоксичных продуктов липолиза. При этом в микросомальных мембранах клеток селезенки (рис.2) распределение радиоактивности между отдельными фракциями ФЛ характеризовалось, с одной стороны, уменьшением интенсивности включения метки в ФХ, СФМ, с другой — усилением ее включения в ЛФХ, ФИ, фосфатидилсерины (ФС), ФЛ и дифосфатидилглицерины (ДФГ).

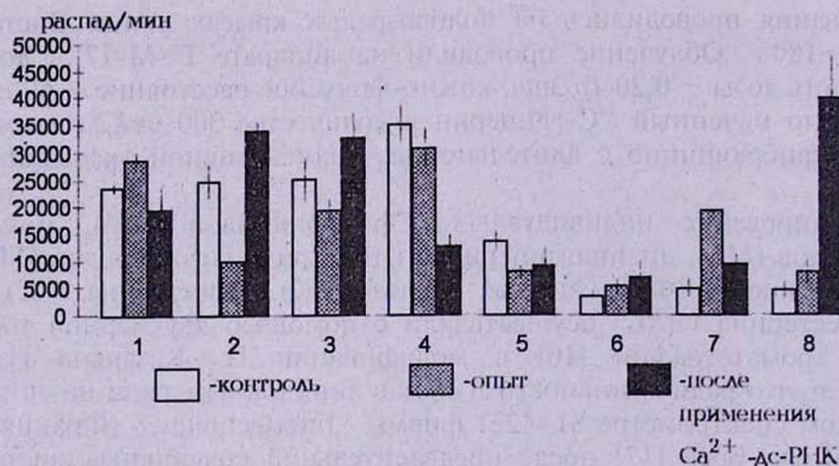


Рис. 1. Включение *in vivo* ^{14}C -глицерина в отдельные фракции ФЛ микросомальных мембран гепатоцитов при ионизирующем облучении и после применения Ca^{2+} -дсРНК. 1 — ЛФХ, 2 — ФИ, 3 — СФМ, 4 — ФХ, 5 — ФЭ, 6 — ФС, 7 — ФК, 8 — ДФГ

Полученные данные являются убедительным доказательством того, что изменения количественного и качественного состава мембранных ФЛ печени и селезенки при ионизирующем облучении [13] обусловлены нарушением синтеза этих соединений. Выявленное отклонение содержания ЛФХ может изменить упаковку липидов в биослой, повышая его проницаемость.

Применение Ca^{2+} -дсРНК характеризуется выраженной тенденцией к нормализации уровня радиоактивности большинства фракций ФЛ как в микросомальных мембранах гепатоцитов (рис.1), так и клеток селезенки (рис.2). При этом биосинтез ФК и ЛФХ в печени почти полностью нор-

мализуется. Заметное уменьшение уровня радиоактивности ФХ и увеличение ФС, на наш взгляд, обусловлено изменением интенсивности процессов взаимопревращения этих соединений.

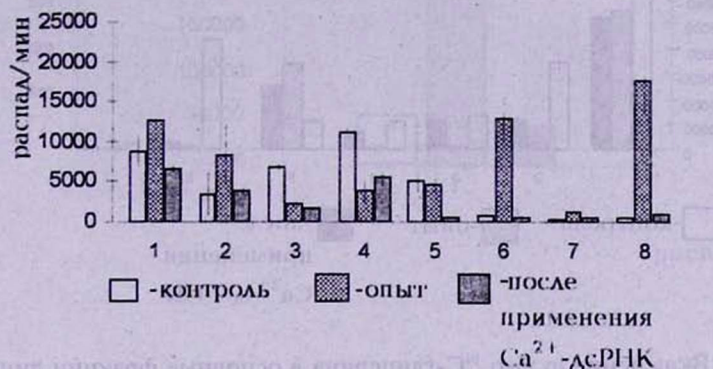


Рис. 2. Включение *in vivo* ^{14}C -глицерина в отдельные фракции ФЛ мембранных клеток селезенки при ионизирующем облучении и после применения Ca^{2+} -дсРНК.

1 – ЛФХ, 2 – ФИ, 3 – СФМ, 4 – ФХ, 5 – ФЭ, 6 – ФС, 7 – ФК, 8 – ДФГ

С целью оценки вклада липогенеза в механизм нарушения липид-липидных соотношений в мембранных образованиях мы изучали также синтез основных представителей липидов печени и селезенки в норме и при ионизирующем облучении. Полученные результаты (рис. 3, 4) показали, что глицерин как предшественник биосинтеза тканевых липидов включается *in vivo* главным образом в состав глицеролипидов, в частности ФЛ (фосфатидов-глицеридов). Примечательно, что в мембранных гепатоцитов и клеток селезенки около 76% метки оказалось в составе суммарных ФЛ.

Ионизирующее облучение сопровождается существенным изменением интенсивности биосинтеза липидов мембран гепатоцитов (рис. 3) и клеток селезенки (рис. 4). В печеночной ткани распределение радиоактивности между отдельными фракциями липидов характеризуется, с одной стороны, значительным изменением скорости включения метки в состав ФЛ, ХС, МГ, ДГ, ТГ и ЭХС, а с другой – резким увеличением радиоактивности незэстерифицированных ЖК (НЭЖК).

При этом в селезенке наблюдается резкое увеличение включения *in vivo* ^{14}C -глицерина в суммарные ФЛ, НЭЖК, МГ и ДГ с одновременным уменьшением радиоактивности ХС, ТГ и ЭХС.

Применение Ca^{2+} -дсРНК характеризуется явно выраженной тенденцией нормализации биосинтеза большинства фракций липидов мембранных клеток печени (рис. 3) и селезенки (рис. 4) подопытных животных. В этих условиях уровень радиоактивности МГ, ДГ и НЭЖК в тканях приближается к норме.

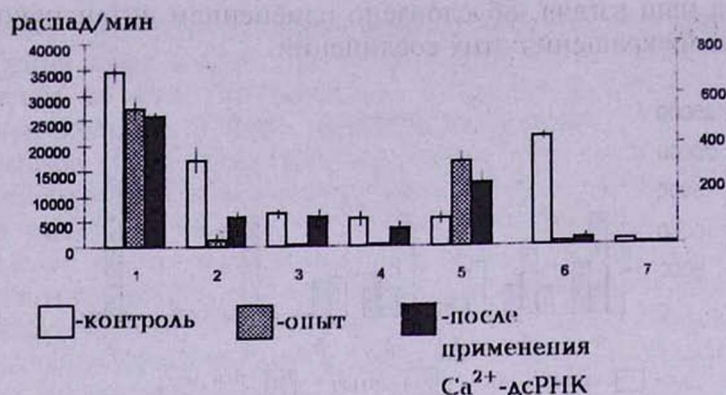


Рис. 3. Включение *in vivo* ^{14}C -глицерина в основные фракции липидов микросомальных мембран гепатоцитов при ионизирующем облучении и после применения Ca^{2+} -дсРНК.

1 – ФЛ, 2 – ХС, 3 – МГ, 4 – ДГ, 5 – НЭЖК, 6 – ТГ, 7 – ЭХС

Итак, полученные результаты в целом свидетельствуют о корригирующем влиянии Ca^{2+} -дсРНК на биосинтез глицеролипидов, в том числе и фосфатидов – глицеридов мембранных структур исследуемых тканей при ионизирующем облучении. Наиболее существенным является определенная нормализация уровня радиоактивности компонентов фосфоинозитного цикла (ФК, ДГ и ФИ) после применения Ca^{2+} -дсРНК.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что снижение уровня большинства фракций мембранных липидов, отличающихся более высоким содержанием полиеновых ЖК в патологически измененных тканях, обусловлено также их активным вовлечением в реакции свободнорадикального окисления [3]. Как известно, изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности фосфолипаз определяют структурно-функциональные свойства биомембран. В связи с этим представляло определенный интерес проследить за изменением ПОЛ и активностью фосфолипазы A_2 в печени и после применения Ca^{2+} -дсРНК.

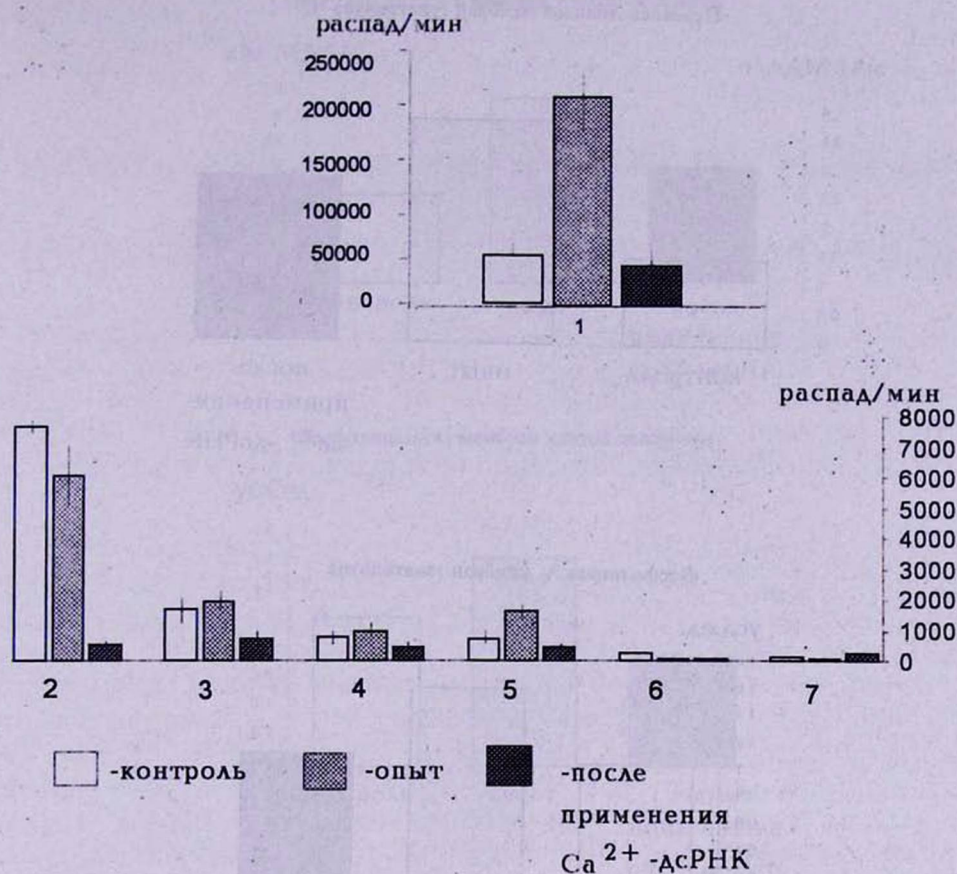


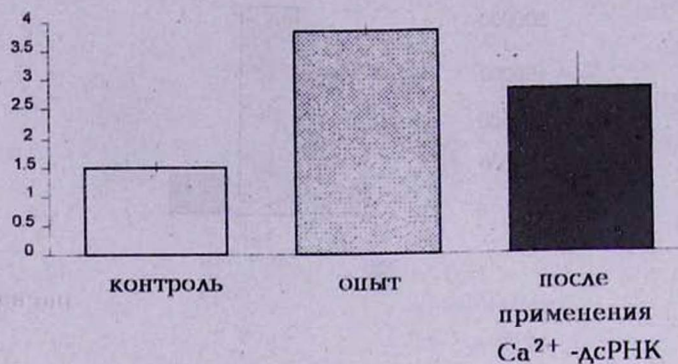
Рис. 4. Включение *in vivo* ^{14}C -глицерина в основные фракции липидов микросомальных мембран клеток селезенки при ионизирующем облучении и после применения Ca^{2+} -дсРНК
1 – Л, 2 – ХС, 3 – МГ, 4 – ДГ, 5 – НЭЖК, 6 – ТГ, 7 – ЭХС

Проведенные исследования позволили установить, что облучение сопровождается значительным увеличением активности ПОЛ и фосфолипазы A_2 как в мембранных структурах печени (рис. 5), так и селезенки (рис. 6).

После применения Ca^{2+} -дсРНК наблюдаются диаметрально противоположные сдвиги в активности ПОЛ и фосфолипазы A_2 в исследуемых тканях (рис. 5, 6).

Перекиси липидов мембран гепатоцитов

мм МДА/г



Фосфолипаза A₂ мембран гепатоцитов

усл.ед.

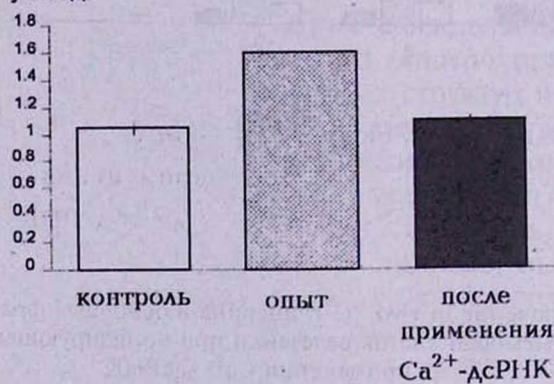


Рис. 5. Изменение активности перекисления липидов и фосфолипазы A₂ микросомальных мембран гепатоцитов при ионизирующем облучении и после применения Ca²⁺-дсРНК

Переокисли липидов мембран клеток селезенки

мм МДА/г



Фосфолипаза A_2 мембран клеток селезенки

усл.ед.

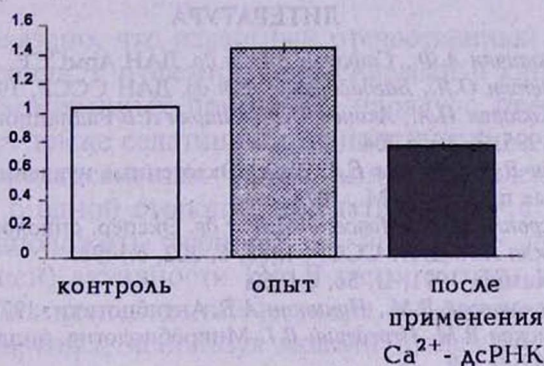


Рис 6. Активность перекисления липидов и фосфолипазы A_2 микросомальных мембран клеток селезенки при ионизирующем облучении и после применения Ca^{2+} -дсРНК

Таким образом, полученные данные указывают на целесообразность применения Ca^{2+} -дсРНК после ионизирующего облучения как эффективного препарата, корригирующего процессы липогенеза, липолиза и перекисления липидов в тканях.

Поступила 11.02.97

**Ca²⁺- ԵՐԿԵՂԹԱ ՈՆԹ-Ի ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ
ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ԵՎ ՉԵՐՕՔՍԻԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ԻՈՆԻԶԱՅՆՈՂ
ՃԱՌԱԳԱՑԹՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ**

**Պ.Ա.Ղազարյան, Մ.Ս.Վարդանյան, Կ.Գ.Ղարազյոզյան, Ա.Ա.Ավետիսյան,
Ա.Վ.Սահարյան, Կ.Ի.Իսրայելյան**

Ուսումնասիրված է երկշրթա ՈՆԹ-ի ազդեցությունը սպիտակ առնետների լյարդի և փայծաղի բջիջների բաղանջների լիպիդային հիմնական ֆրակցիաների և առանձին ֆոսֆոլիպիդների in vivo կենսասինթեզի և լիպիդային գերօքսիդացման

պրոցեսների վրա նորմալում և իոնիզացնող ճառագայթման ժամանակ: Բացահայտված է կալցիումական երկշղթա Ռ-ՆԹ-ի արդյունավետությունը կենսաթաղանթների կայունացման և լիպիդային բաղադրամասերի փոխանակության կանոնավորման գործում:

EFFECT OF Ca^{2+} -dsRNA ON LIPIDS BIOSYNTHESIS AND SUPEROXIDATION AT IONIZING IRRADIATION

P.A.Kazarian, M.S.Vardanian, K.G.Karageuzyan, A.A.Avetissian,
A.V.Saharyan, K.I.Israelyan

The effect of dsRNA on the basic functions of lipids in cell membranes of white rats liver and spleen, as well as on the processes of biosynthesis and lipid superoxidation of certain phospholipids in vivo in norm and ionizing irradiation has been studied. It is revealed the effectivity of Ca^{2+} -dsRNA at levelling of biomembranes and regulation of lipid components metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А.С., Казарян А.Ф., Сафарян А.С. и др. ДАН АрмССР, 1983, 5, с.228.
2. Агабян А.С., Давтян О.Я., Багдасарян А.А. и др. ДАН СССР, 1988, 6, 302, с.31.
3. Баджигян С.А., Казарян П.А., Акопов С.Э., Саарян А.В. Радиационная биология. Радиоэкология, 1995, 3, 35, с.364.
4. Белоус А.М., Годин В.П., Панков Е.А. В кн.: Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы. М., 1974, с.3.
5. Захарян Р.А., Месроbian Н.П., Мовсесян А.В. и др. Экспер. онкология, 1985, 3, 7, с.54.
6. Захарян Р.А., Рухкян Л.А. ДАН СССР, 1988, 6, 302, с.1498.
7. Захарян Р.А. Биохимия, 1991, II, 56, с.1660.
8. Земсков А.М., Провоторов В.М., Никитин А.В. Антибиотики, 1979, II, с.853.
9. Земсков А.М., Земсков В.М., Передерий В.Г. Микробиология, эпидемиология и иммунология, 1982, 9, с.9.
10. Земсков А.М., Земсков В.М., Передерий В.Г. и др. Антибиотики, 1982, 9, с.64.
11. Казарян П.А., Элоян Д.В. В кн.: Хроматографические методы. М., 1982, с.23.
12. Казарян П.А., Саарян А.В., Израелян К.И. др. Тез. II Межд. радиобиол. конгр., Киев, 1993, с.427.
13. Казарян П.А., Саркисян А.Г., Саарян А.В. и др. В сб.: Влияние факторов окружающей среды на здоровье населения. Ереван, 1994, с.82.
14. Ланкин В.З., Гуревич С.М., Бурлакова Е.Б. В кн.: Биоантиокислители. М., 1975, с.73.
15. Соловьев В.Д., Бенгемиров Т. В кн.: Интерферон в теории и практике медицины. М., 1981, с.321.
16. Шмаль Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
17. Brey G.A. Anal. Biochem., 1960, 1, p.279.
18. Grassl M., Moellering H. A. Z. Anal. Chem., 1969, 243, S.416.
19. Kazarian P.A., Nazaretian M. Abstr. for the XIth Meeting of the Intern. Society of Haematology, 1991, Basel, p.14.
20. Kazarian P.A., Saarian A.V., Karageuzyan K.G. et al. Abstr. for the XIIIth Meeting of the Intern. Society of Haematology, 1995, Istanbul, p.884.