

Специфика действия синтетических N-терминалей (1-9, 1-15) мозгового иммунофилина на нарушение метаболизма фосфолипидов в мембранах лимфоцитов крови больных семейной средиземноморской лихорадкой

К.Г. Карагезян, М.К. Карагезян

Институт молекулярной биологии НАН РА

375014 Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: периодическая болезнь, фосфолипиды, иммунофилины, иммунитет, нейтральные фосфолипиды, кислые фосфолипиды, мембраны лимфоцитов, фосфолипид-фосфолипидные соотношения

Вездесущность иммунофилинов (ИФ) различного происхождения, ответственных в совокупности за формирование и обеспечение стабильного уровня иммунологического статуса организма, очевидна [13, 16, 17]. В связи с отмеченным особым интерес представляют ИФ, выделенные в последнее время А.Галояном и Б.Гурвиц [19] из гипоталамуса крупного рогатого скота, наделенные свойствами, характерными для белка GK506 [29, 30]. Установление аминокислотной последовательности N-терминального региона этого ИФ [20] послужило синтезированию его 1-9 и 1-15 фрагментов [30] и изучению на первых порах особенностей их действия на метаболизм фосфолипидов (ФЛ) мозговой ткани [20], а затем и мембран лимфоцитов (МЛ) селезенки белых крыс при отравлении их микотоксином зеараленоном (ЗН).

Выявление и изучение особенностей молекулярных механизмов токсикозов различного происхождения на иммунологический статус организма и изыскание результативных путей по их нивелированию и коррекции представляет не только существенный академический интерес, но имеет также важное прикладное значение. С отмеченной точки зрения, особого внимания заслуживает изучение комплекса структурно-функциональных и метаболических расстройств ФЛ мембранных образований, в том числе и МЛ, различного происхождения [11], ответственных за срывы стабильного, филогенетически запрограммированного в норме статуса ФЛ-ФЛ соотношений в данной биологической системе [9, 10] и в связи с этим функционирования мембраносвязанных протеинов [3, 4], имеющих прямое отношение к нарушениям деятельности иммунной системы организма.

Отсутствие информации в отмеченном направлении вызывает интерес к расшифровке роли ФЛ, в ча-

стности их мессенджерной функции [27], современное понимание которой в реакциях иммунитета немислимо без учета каталитической активности реакций деацилирования и реацилирования мембранных ФЛ [1, 2, 8, 12]. Лидирующая роль последних обусловлена главным образом их основной позицией в реализации постоянно совершающейся трансдукции внешнего сигнала внутрь клетки как основного условия в обеспечении ее физиологической активности, иммуномодулирующей, иммуностабилизирующей функции. С отмеченной точки зрения, особого внимания заслуживают результаты наших ранее проведенных исследований [20], продемонстрировавшие ярко выраженные дозозависимые отклонения в качественном составе и количественном содержании мозговых ФЛ нейтральной и кислой природы (НФЛ и КФЛ соответственно) под действием испытанных нами N-терминалей ИФ. Отмеченные сдвиги в значительной степени были обусловлены повышенным уровнем активности фосфолипазы А₂, катализирующей, как известно, реакцию деацилирования ФЛ-глицеридов, преимущественно фосфатидилхолинов (ФХ), сопровождающуюся выходом повышенных концентраций лизофосфатидилхолинов (ЛФХ). Согласно научной информации последних лет [6, 21-24, 26, 28, 31], ЛФХ отводится важное место в регуляции клеточной активности, в том числе и процессов иммунитета.

В связи с отмеченным сформировалась идея по развитию этих исследований в направлении изучения в опытах *in vitro* особенностей изменения ФЛ-ФЛ соотношений в МЭ на различных этапах развития периодической болезни (стадия острого приступа и ремиссия) и изучения на этом фоне особенностей действия отмеченных выше N-терминалей ИФ в опытах *in vitro*.

Материал и методы

Взятие проб цельной крови больных периодической болезнью в стадии острого приступа производилось в клинических условиях из локтевой вены. Лимфоциты крови отделяли центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фикол-400-верографин [19] и в количестве 10⁷ мл преинкубировали при 37°C в 0.01 М растворе Трис-НСI буфера с рН 7.4 в смеси со средой 199 (в соотношении 1:4) в присутствии митогена конканавалина А (6 мкг/мл). МЛ, осаждавшиеся после осмотического шока лимфоцитов, осаждали повторным центрифугированием и использовали для определения в них ФЛ [25], малонового диальдегида [10] и белка [12] после 2–6-часового инкубирования их в среде Трис-НСI буфера при 37°C, рН 7.4 в присутствии 1 нм, 0,1 мкм и 10,0 мкм 1-9 и 1-15 N-терминалей ИФ (согласно трем указанным концентрациям 2-х N-терминалей ИФ в отдельности – всего 6 параллелей по каждой временной экспозиции 3Н). Таким образом, объединенные МЛ 18 животных по каждой опытной группе подразделялись на 6 равных частей и инкубировались описанным выше способом, после чего они осаждались центрифугированием и высушивались концентрированным ацетоном до порошкообразного состояния постоянного веса.

Экстракцию ФЛ из ацетоновых порошков МЭ производили по Folch J. [18] в модификации К.Г. Карагезяна [12]. Фракционирование ФЛ осуществляли методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластинки "Мерк", Германия) в системе растворителей хлороформ:метанол:аммиак 65:35:5. Идентификацию хроматографических пятен индивидуальных ФЛ производили с помощью стандартов ("Сигма", США) в атмосфере, насыщенной парами йода. Количество ФЛ выражали в мкг липидного фосфора, минерализованного сжиганием проб ФЛ в смеси концентрированных серной и азотной кислот в песочной бане при 180–200°C до состояния прозрачности и бесцветности. Содержание фосфора ФЛ определяли спектрофотометрическим измерением экстинкции окрашенного раствора при длине волны 535 нм и рассчитывали на 2 сухого остатка МЛ.

Результаты и обсуждение

Результаты предварительно проведенных исследований по выявлению специфики действия отдельно испытанных концентраций (1 нм, 0,1 мкм и 10,0 мкм) 1-9 и 1-15 N-терминалей ИФ продемонстрировали однотипность направленности и дозозависимости степени выраженности количественных сдвигов ФЛ всех

категорий. В связи с отмеченным мы нашли целесообразным отразить в представляемом демонстрационном материале усредненные величины по количественным изменениям изученных показателей.

Как вытекает из данных, отраженных на рис. 1 (а,б,в), характеризуются чувствительным уменьшением в МЛ суммы нейтральных ФЛ (СНФЛ) – ФХ, фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), сфингомиелинов (СФМ) и противоположно направленных сдвигов суммы кислых ФЛ (СКФЛ) – монофосфоинозитидов (МФИ), фосфатидилсеринов (ФС), фосфатидных кислот (ФК) и кардиолипинов (КЛ), что особенно наглядно проявляется через 4 и 5 ч после инкубации.

Наиболее отчетливо наблюдавшееся при этом увеличение количества ФС в МЛ свидетельствовало об активировании процессов деметилирования ФХ в ФЭ, содержание которых, однако, не только не возрастало, а даже заметно убывало, указывая тем самым на возможное трансформирование их в ФС, являющихся активаторами ферментов дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, не лишено основания предположение о действии изученных агентов и на активность ФС-декарбоксилазы в обратную направленную реакцию, что проливает свет на современное осмысление регуляторной роли ФЛ в реакциях тканевого и организменного иммунитета, являющихся процессом энергозависимым. Исходя из вышеизложенного, можно заключить об исключительной важности КФЛ, в частности ФС, КЛ и ФК в энергогенерирующей и энерго-транспортирующей функциях элементов клетки, ответственных в целом за формирование иммуномодулирующей и иммуностабилизирующей активности организма, что особенно важно при изученной патологии.

Следовательно, в результате столь демонстративных качественно-количественных изменений ФЛ и ФЛ-ФЛ соотношений, регистрируемых в МЛ крови больных периодической болезнью в острой стадии, весьма очевидно возникновение принципиально нового неестественного типа ФЛ микроокружения мембраносвязанных протеинов. Благодаря глубоким изменениям фосфолипидного компонента МЛ в этих условиях имеет место формирование своеобразного дисбаланса в общем статусе функционирования этих клеточных элементов, проявляющегося в виде соответствующего дефекта в специфике ответной взаимосвязи антигена с рецептором. Этот сдвиг обусловлен главным образом гетерогенностью их субпопуляционного состава и особой аффинностью к рецепторам, активно комплексующимся с различными мембраносвязанными высокоактивными ФЛ-зависимыми ферментами.

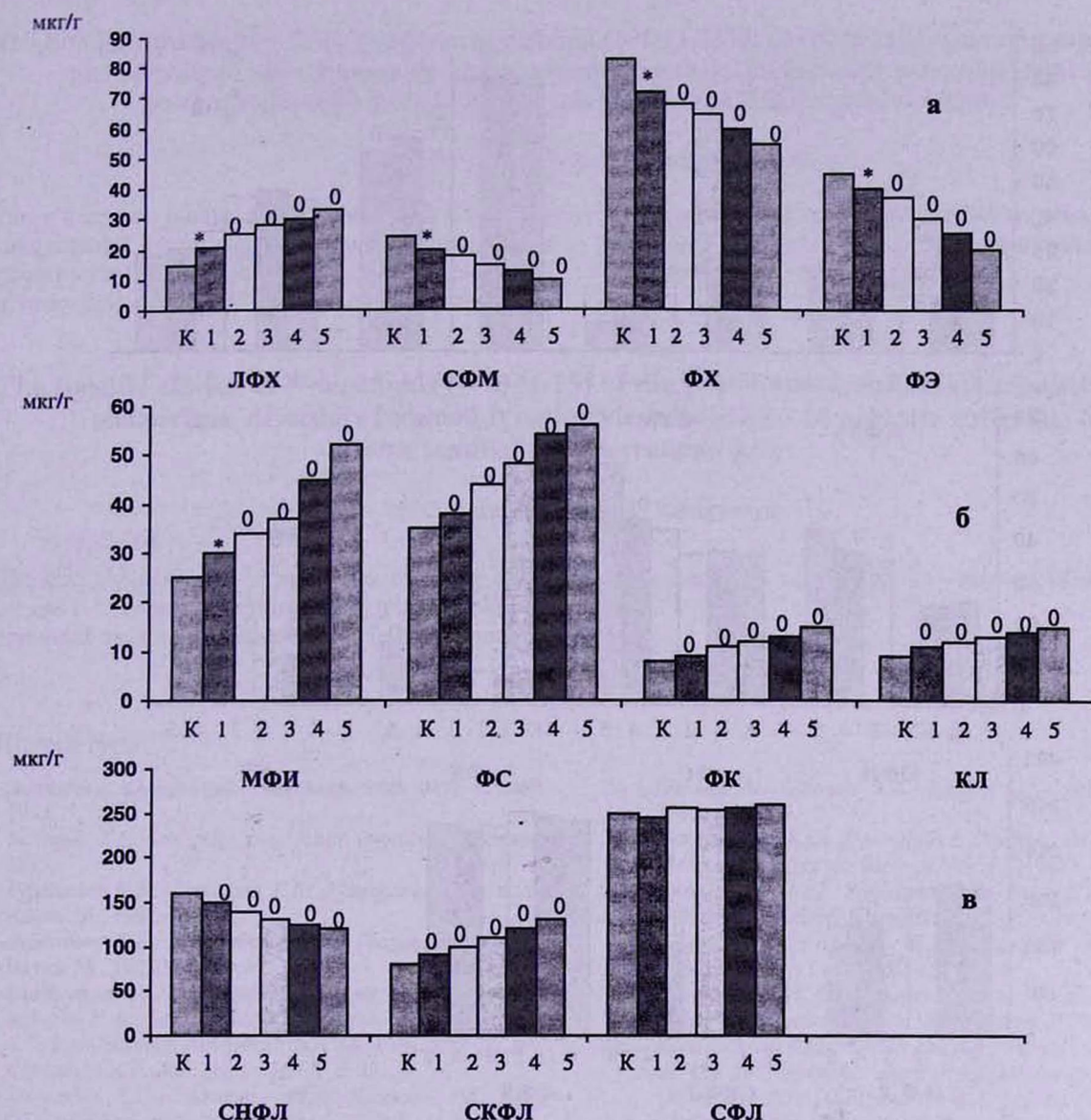


Рис. 1. Количественные изменения НФЛ (а), КФЛ (б), СНФЛ, СКФЛ, СФЛ (в) (в мкг липидного фосфора/ г сухого остатка МЛ) в МЛ крови больных периодической болезнью в стадии острого приступа. К- контроль; 1, 2, 3, 4, 5 – часы после инкубации МЛ в среде трис-НСI буфера.

Примечание: о – $0.02 > p > 0.01$; * – $0.05 > p > 0.02$; без обозначений – сдвиги статистически недостоверны

Как показали результаты проведенных исследований по всем опытным группам, отраженные на рис. 2 (а,б,в), благотворное влияние примененных N-герминалей ИФ наиболее отчетливо проявляется, как правило, в течение первых 2 часов инкубации и выражается в нормализации уровней изученных фракций ФЛ, устанавливающихся в пределах контрольных показателей. Примечательно, что тенденция к упорядочиванию нарушенных сторон метаболизма ФЛ в МЛ прослеживается и в более поздние сроки инкубации, однако при этом расхождения уровней ФЛ по сравне-

нию с нормой продолжают оставаться статистически достоверными, свидетельствуя тем самым о необратимости расстройств, развивающихся в картине ФЛ-ФЛ соотношений в МЛ на протяжении 3–5-часовой экспозиции фрагментов изученного пептида. По-видимому, это можно объяснить формированием высоких (летальных) концентраций лизоформ ФЛ и продуктов перекисления жирных кислот, обладающих ярко выраженным мембранотоксическим, мембранолитическим действием.

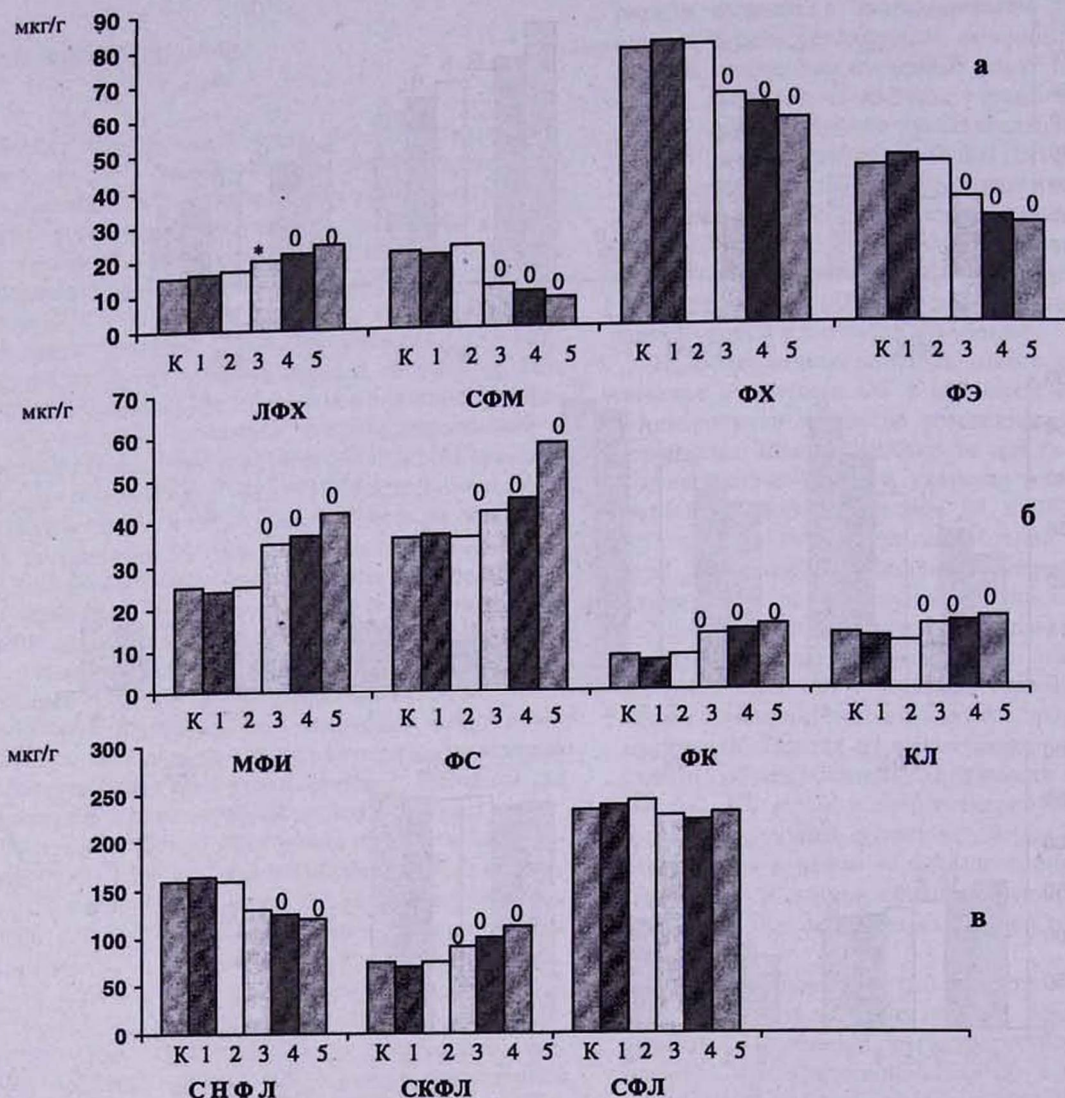


Рис. 2. Усредненные данные по эффектам 1 нм, 0.1 мкм и 10.0 мкм 1-9 и 1-15 N-терминалей ИФ на динамику количественных изменений НФЛ (а), КФЛ (б), СНФЛ, СКФЛ и СФЛ (в) (в мкг липидного фосфора/г сухого остатка МЛ) в МЛ крови больных периодической болезнью в стадии острого приступа. К – контроль; 1, 2, 3, 4, 5 – часы после инкубации. МЛ в присутствии синтетических аналогов ИФ.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1

Отмеченные выше срывы в метаболизме мембранных ФЛ в условиях изученной патологии, приводящие к чрезмерному повышению концентрации веществ, обладающих ярко выраженным детергентным эффектом на МЛ, имеют в своей основе глубокое изменение уровня гидрофобности последних. В связи с этим формирование нового "патологического" стереотипа липидного окружения протеинов МЛ чревато их конформационными пертурбациями, утратой аффинности рецепторов к характерным раздражителям и норм лиганд-рецепторных взаимоотношений в МЛ как показате-

тель неполноценности их участия в формировании иммунного статуса организма.

Полученные результаты проливают свет на более обстоятельное изучение основ выявленных феноменов на молекулярном уровне и на поиск приемлемых объяснений время-зависимости нивелирующих эффектов 1-9 и 1-15 синтетических фрагментов иммунофилина на расстроенные звенья липидного метаболизма в МЛ в условиях острого приступа периодической болезни и их значение в регуляции деятельности иммуномодулирующих систем организма.

Поступила 15.04.04

Ուղեղի իմունոֆիլինի N-վերջավորությունների (1-9 և 1-15) ազդեցության յուրատիպությունը պարպերական հիվանդությամբ հիվանդների արյան լիմֆոցիտների թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդային փոխանակության խանգարումների պայմաններում

Կ.Գ. Ղարազյույան, Մ.Կ. Կարազյույան

Յույց է տրված իմունոֆիլինի սինթետիկ 1-9 և 1-15 անոցյալների խիստ արտահայտված կարգավորիչ ազդեցությունը պարպերական հիվանդությամբ տառապող հիվանդների արյան լիմֆոցիտների թաղանթներում

ում սուր մոպայի ժամանակ արձանագրվող ֆոսֆոլիպիդների փոխանակության խանգարումների վերականգնման ընթացքի վրա:

The specific action, of N-terminals (1-15 1-15) of the brain immunophilin on phospholipid metabolism disorders in blood lymphocyte membranes of patients suffering with familial Mediterranean fever

K.G. Karageuzyan, M.K. Karagozyan

The data obtained have shown the normalising effect of 1-9 and 1-15 N-terminals of synthetic immunophilin on phospholipid metabolism abnormalities in blood lympho-

cyte membranes of patients with familial Mediterranean fever.

Լիտերատուրա

1. *Ասաթյան Լ.Ս.* Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 1993.
2. *Բաթյան Կ.Բ.* Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 1989.
3. *Բурлакова Е.Б., Архипова Г.В., Голощанов А.Н. и др.* Наука. М., 1982а, с. 74.
4. *Բурлакова Е.Б., Джалябова М.И., Гвахария В.О. и др.* Наука. М., 1982б, с. 113.
5. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Наука. М., 1972.
6. *Захарян Р.А., Тадевосян Ю.В., Азарян Н.Г., Карагеузян К.Г.* Биол. журнал Армении НАН РА, 1988, 2, т. 42, с. 99.
7. *Карагеузян К.Г.* Лаб. дело, 1969, 1, с. 23.
8. *Карагеузян К.Г., Тадевосян Ю.В., Батикян Т.Б.* ДАН СССР, 1986, т. 286, 2, с. 465.
9. *Крепс Е.М.* XXII Баховские чтения. Л., Наука, 1967, с. 74.
10. *Крепс Е.М.* Наука, 1981, с. 330.
11. *Матвеевская О.П., Славинская Е.А., Кучеренко Н.Е.* Вспр. мед. химии, 1994, т. 40, в. 2, с. 28.
12. *Тадевосян Ю.В.* Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 1996.
13. *Baughman G., Wiederrecht G.T., Campbell N.F. et al.* Molecular and Cellular Biology, 1995, 15, p. 4395.
14. *Belshaw P.J., Meyer S.D., Johnson D.D., Romo D. et al.* Synlett., 1994, 6, p. 381.
15. *Boyum A.* Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, Suppl. 97, p. 28.
16. *Czar M.J., Owens-Grillo J.K., Dittmar K.D., Hutchison K.A. et al.* Journal of Biological Chemistry, 1994a, v. 269, p. 11155.
17. *Czar M.J., Owens-Grillo J.K., Yem A.W., Leach K.L. et al.* Molecular Endocrinology, 1994b, 8, p. 1731.
18. *Folch J., Lees M., Sloane G. J.* Biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497.
19. *Gurvits B., Galoyan A.A.* Journal of Neurochemistry, 1995, 65, S178.
20. *Karageuzyan K.G., Galoyan A.A., Hovsepyan L.M. et al.* Molecular Membrane Biology, 1996, 13, p. 49.
21. *Karageuzyan K.G., Zakharyan R.A., Bakuntz K.A., et al.* Giuseppe Percellati Foundation International Meeting of Neurochemical Aspects of Phospholipid Metabolism (Abstracts). Italy, Perugia, 1988, p. 66.
22. *Karageuzyan K.G., Zakharyan R.A., Hakopyan Zh.I.* FEBS. 19th Meeting, Rome, 1989, Abstract TH113.
23. *Karageuzyan K.G., Zakharyan R.A., Hovakimyan S.S. et al.* The 19th World Congress of the International Society for fat Research (ISF) and the 27th Annual Meeting Oil Chemists. Japan, Tokyo, 1988, Abstr 3P12, p. 357.
24. *Korotaeva A.A., Cheglakov I.B., Morozkin A.D. et al.* Membr. Cell. Biol., 1997, 10, p. 521.
25. *Lowry O.H., Rosebrough, Farr A.L., Randal R.J. J.* Biol. Chem., 1951, 193, 1, p. 265.
26. *Nakano T., Raines E.W., Abraham J.A. et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, p. 1069.
27. *Pelech S.L., Vance D.E.* Trends in Biochemical Sciences, 1989, 14, 1, p. 28.
28. *Quinn M.T., Kondratenko N., Parthasarathy S.* Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1082, p. 293.
29. *Radanyi C., Chambrand B., Baulieu E.E.* Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 1994, 91, p. 11197.
30. *Rouvierefourmy N., Craescu C.T., Mispeltier J., Lebeau M.C., Baulieu E.E.* European Journal of Biochemistry, 1995, 231, p. 761.
31. *Sakai M., Miyazaki A., Hakamata H., Sasaki T., Yui S., Yamazaki M. et al.* J. Biol. Chem., 1994, 269, p. 31430.