

Теоретическая и профилактическая медицина

УДК 616.24-002.5-07:616.153.915

Специфика нарушений фракционного состава фосфолипидов в мембранах лимфоцитов при экспериментальном туберкулезном воспалении легких

К.Г. Карагезян*, М.Д. Сафарян, С.С. Овакимян*,
Д.А. Арутюнян**, Г.В. Элбакян*, А.Р. Хачатрян*,
А.В. Казарян*, О.М. Амирханян***

** Лаборатория молекулярных основ липидологии Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии НАН РА*

*** Республиканский противотуберкулезный диспансер МЗ РА 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26*

Ключевые слова: туберкулезное воспаление легких, мембраны лимфоцитов, фосфолипиды, нейтральные фосфолипиды, кислые фосфолипиды, фосфатидилхолины, лизофосфатидилхолины, фосфолипаза А₂

Согласно научной информации последних лет [1-6], лизофосфатидилхолины (ЛФХ) выступают в роли мощных индукторов интерферона не только в крови, но и, особенно, в мозговой ткани, свидетельствуя тем самым о своем непосредственном участии в инициации, становлении и генерализации иммунологической активности организма [8,10-13,16-18]. Прямым подтверждением высказанных соображений являются результаты исследований по экспериментальному аллоксановому диабету. Согласно многочисленным наблюдениям прослеживается параллелизм в однонаправленности количественных сдвигов как в цельной крови, так и мембранах элементов крови ЛФХ и иммуноглобулинов определенных категорий. Эти и ряд других наблюдений [7,14,15,19,20,28-30,33,37,40,41] подтвердили факт многократного повышения содержания ЛФХ в различных биологических системах диабетогенных животных и послужили основанием к осуществлению настоящего специального исследования в направлении изучения особенностей качественно-количественных сдвигов всего спектра фосфолипидов (ФЛ) на уровне мембран лимфоцитов (МЛ) селезенки, имеющих прямое отношение к иммунитетформирующим системам и,

следовательно, активному участию в обеспечении компенсаторно-приспособительных (защитных) механизмов как нормально, так и особенно патологически функционирующего организма. Отмеченное, в частности, касается и иммунологических срывов при туберкулезном воспалении легких в клинике и эксперименте [24-26,35,36].

Материал и методы

Исследования проводили на 36 морских свинок 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 на 30-й день после моделирования туберкулезного воспаления легких под гексаналовым наркозом. Лимфоциты селезенки отделяли центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фикол-400-верографин-12 и инкубировали в количестве 10⁷ мл при 37 °С в 0,01 М растворе трис-HCL 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 и использовали на предмет определения в них ФЛ после предварительного обезвоживания их путем получения ацетоновых порошков. С отмеченной целью производилась трехкратная обработка свежеполученных МЛ в фарфоровой ступке 3-4 мл концентрированного ацетона при тщательном растирании образовавшейся суспензии пестиком и высушивании ее в вытяжном шкафу или под током газообразного азота [22]. Экстракцию ФЛ из исследуемого ацетонового порошка производили по Фолчу [39], используя в качестве экстрагента хлороформ-метаноловую смесь в объемных соотношениях 2:1. Соблюдение указанной пропорциональности компонентов использованной смеси имеет исключительно важное значение в целях достижения максимального экстрагирования ФЛ из первоисточника. Обезвоживание последнего в виде отмеченных выше ацетоновых порошков является принципиально важным условием в соблюдении указанных концентраций составляющих экстрагента и достигается полным удалением водной среды объекта исследования. Фракционирование индивидуальных представителей ФЛ из общего экстракта этих соединений достигалось методом одномерной восходящей хроматографии на тонком слое силикагеля, предварительно нанесенного на стеклянную поверхность (20x20 см) и активированного соответствующим образом, согласно указанной методике, с использованием системы растворителей: хлороформ – метанол – аммиак в объемных соотношениях 65:35:5. Количество ФЛ выражали в мкг липидного фосфора, получаемого в результате минерализации высушенных в эксикаторе или вытяжном шкафу экстрактов ФЛ индивидуальных фракций, снятых с хроматограмм (путем соскабливания пятен

ФЛ с силикагелем, окрашенным в желтый цвет после предварительного помещения пластинок в среду, насыщенную парами йода в смеси концентрированных серной и азотной кислот при 180-200°C).

Результаты и обсуждение

Как вытекает из приведенного в таблице демонстрационного материала, 30-й день развития туберкулезного воспаления легких у подопытных животных характеризуется значительным (21,8 %) возрастанием количественного содержания общей суммы всех ФЛ (СФЛ) в МЛ, что обеспечивается за счет чувствительного увеличения в них (64,8 %) суммы кислых ФЛ (СКФЛ): монофосфоинозитидов (МФИ), фосфатидилсеринов (ФС), фосфатидных кислот (ФК) и кардиолипинов (КЛ), наделенных, согласно укоренившимся в настоящее время представлениям [9], высоким стимулирующим воздействием на интенсивность течения дыхательных процессов на уровне субклеточных образований и в целом на общеорганизменном уровне.

Таблица

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
Фосфатидилэтанолламины	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	-

Примечание. n = 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

Отмеченные изменения в качественно-количественном составе индивидуальных представителей КФЛ сопровождаются с несколько специфичными отклонениями фракционного спектра и нейтральных (НФЛ), а также их суммы (СНФЛ), слагающейся из количественного содержания лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), сфингомиелинов (СФМ), фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ). Примечательно, что все они за исключением ЛФХ убывали в своем количестве статистически достоверно по сравнению с контролем. Что касается ЛФХ, то на фоне ярко выраженного туберкулезного воспаления легких их содержание претерпело более чем пятикратное возрастание (574,7 %) при сопоставлении с нормой при одновременно регистрируемой противоположной направленности сдвигов уровней СФМ (44,3 %), ФХ (64,6 %) и ФЭ (44,6 %). Неоднократно наблюдавшийся диссонанс в количественных изменениях отдельных представителей НФЛ, обусловленный ярко выраженным увеличением уровня ЛФХ, служит поводом для серьезных раздумий в плане осмысления роли указанных соединений в формировании соответствующих патобиохимических механизмов, определяющих суть молекулярно-биологических отклонений, лежащих в основе этиологии различных болезненных состояний организма [21], в том числе и при его поражении туберкулезным процессом. На основании многочисленных ранее проведенных наблюдений сложилось четкое представление о мембранотоксическом мембранолитическом действии сверхвысоких концентраций ЛФХ, что по существу воспринимается как факт неукоснительного участия этих соединений при различных заболеваниях в качестве серьезных патогенетических факторов. Со всей очевидностью последнее воспринимается как проявление серьезного тревожного сигнала, свидетельствующего о чрезмерном повышении активности фосфолипазы A_2 , катализирующей реакцию деацилирования ФХ с образованием ЛФХ, свободных жирных кислот полиенового ряда, вовлекающихся в значительном количестве в реакции свободнорадикального окисления с образованием продуктов перекисления токсического действия. Вместе с тем известно и о благотворном влиянии умеренно завышенных концентраций ЛФХ, слегка доминирующих над верхними границами нормы, в поддержании физиологически запрограммированных норм клеточной активности, в частности в иммунитетстимулирующих превращениях, как частное проявление одной из многочисленных компенсаторно-приспособительных реакций организма. Указанной категории лизопроизводных ФЛ в последнее время поистине придается исключительно важное значение как в общебиологическом, так и патофизиологическом понимании, о чем свидетельствуют материалы Годичной сессии Нью-Йоркской Академии наук 2002 г. [38]. Однако по сей день остается исключительно проблематичным истинный молекулярно-биологический и биохимический механизм вовлечения ЛФХ в регуляторные и патогенетические системы

нормально функционирующего организма при его экстремальных и болезненных состояниях, в частности при туберкулезном воспалении легких.

Согласно результатам проведенных исследований, диссонанс в направленности количественных изменений СНФЛ и СКФЛ в МЛ селезенки морских свинок, страдающих туберкулезным воспалением легких, серьезным образом отражается и на коэффициенте (К) отношения СНФЛ к СКФЛ ($K_{\text{СНФЛ/СКФЛ}}$), в значительной степени понижающемся (40,2 %) в МЛ больных животных. Этот сдвиг расценивается как отчетливое подтверждение имеющего место чувствительного расстройства постоянства филогенетически стабилизированного в норме постоянства ФЛ-ФЛ соотношений как важнейшего залога в физиологически обусловленной перманентности участия отдельных категорий ФЛ в регуляторных механизмах различных биологических систем организма. Они, прежде всего, обусловлены интенсивно протекающими взаимосвязанными и взаимообусловленными контактами между мембраносвязанными ФЛ и протеинами преимущественно ферментной природы. Значение последних не подлежит переоценке, поскольку издавна сформировалась неоспоримая точка зрения о незаменимости постоянства физиологических уровней ФЛ-ФЛ соотношений, ответственных за обеспечение норм клеточной активности и организма в целом [31,32].

В завершение считаем правомерным подчеркнуть факт получения принципиально новой научной информации относительно особенностей качественно-количественных расстройств различных категорий ФЛ в МЛ морских свинок с моделированным у них туберкулезным воспалением легких. Они согласуются с результатами ранее проведенных исследований, касающихся особенностей нарушений метаболизма ФЛ и процессов перекисеобразования при туберкулезном воспалении легких в клинике и эксперименте [23,27,34] и терапевтической эффективности вновь разработанных методов комбинированной антиоксидантотерапии. Последние служат недвусмысленным стимулом к поиску и изысканию новых, наиболее результативных средств антитуберкулезного значения.

Поступила 04.05.08

Լիմֆոցիտների թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդների ֆրակցիոն կազմի խախտումների առանձնահատկությունները՝ թոքերի փորձարարական տուբերկուլյոզային բորբոքումների պայմաններում

**Կ.Գ. Ղարազյուզյան, Մ.Դ. Մաֆարյան, Ս.Ս. Հովակիմյան,
Դ.Ա. Հարությունյան, Գ.Վ. Էլբակյան, Ա.Ռ. Խաչատրյան,
Ա.Վ. Ղազարյան, Հ.Մ. Ամիրխանյան**

Ծովախոտուկների փայծաղի լիմֆոցիտների թաղանթներում՝ թոքերի փորձարարական տուբերկուլյոզային բորբոքումների պայմաններում, արձանագրվում է հիպօքսիկ համախտանիշի առաջացման փաստ, որը պայմանավորված է տարբեր կարգի ֆոսֆոլիպիդների որակաքանակական վառ արտահայտված տեղաշարժերով: Վերջինս, գլխավորապես, պայմանավորված է լիզոֆոսֆատիդիլ խոլինների քանակի բազմապատիկ ավելացմամբ և դրան զուգահեռ ֆոսֆատիդիլ խոլինների մակարդակի զգալի նվազմամբ, մի բան, որ արդյունք է ֆոսֆոլիպազ A_2 -ի խիստ արտահայտված ակտիվացմամբ: Լիզոֆոսֆատիդիլ խոլինների առաջացման հետ մեկտեղ նկատվում է ազատ չհագեցած ճարպաթթուների և նրանցից առաջացած լիպիդային գերօքսիդների քանակի զգալի աճ, որոնք համատեղ օժտված են վառ արտահայտված թաղանթատորյիկ, թաղանթալիտիկ ակտիվությամբ՝ որպես զանազան ախտաբանական վիճակների ախտածագման հիմքում ընկած հիմնական գործոններից մեկը:

Peculiarities of phospholipids' composition disorders in lymphocyte membranes under conditions of experimental tuberculosis of lungs

**K.G. Karageuzyan, M.D. Safaryan, S.S. Hovakimyan, D.A. Harutunyan,
G.V. Elbakyan, A.R. Khachatryan, A.V. Ghazaryan, H.M. Amirkhanyan**

The data obtained have shown that under conditions of oxidative stress in guinea pigs at experimental tuberculosis of lungs significant disorders in qualitative-quantitative composition of different categories of phospholipids are registered in lymphocyte membranes. Abnormalities mentioned are conditioned by significant increase in the level of lysophosphatidyl cholines with a simultaneous decrease in phosphatidyl cholines composition. The latter is conditioned by pronounced activation of phospholipase A_2 , which is catalyzing the process of deacylation of phosphatidyl cholines and formation of high concentrations of both lysophosphatidyl cholines free unsaturated fatty acids and products of free radical peroxidation of them. These changes are characterized by formation of a complex which has very active membranotoxic and membranelytic activities.

According to the data obtained all these products are the main substances, which are conditioning the initiation, formation and generalization of different mechanisms underlying the genesis of different pathological states of the organism.

Литература

1. Агабалян А.С., Давтян О.Я., Багдасарян А.А. и др. Влияние кальциевых форм РНК на развитие опухолевого процесса, ДНАН РА, 1989, т.88, 1, с.31-34.
2. Агабалян А.С., Рухкян Л.А., Захарян Р.А. Подавление размножения ретровируса MuLV препаратами Са-дс-РНК и Са-низкомолекулярной РНК из дрожжей, ДНАН РА, 1989, т.88, 2, с.93-96.
3. Агабалян А.С., Назаров Л.У., Базиян А.Р. и др. Дс-РНК как фактор, стимулирующий регенеративные и репаративные процессы в раневых тканях, ДНАН РА, 1993, т.94, 3, с.173-177.
4. Агабалян А.С., Агавелян А.М., Давтян О.Я. и др. Применение низкомолекулярной РНК для профилактики послеоперационных осложнений, ДНАН РА, 1997, т.98, 2, с.166-169.
5. Агабалян А.С., Туманян М.А., Захарян Р.А. Стимуляция восстановительных процессов при экспериментальном гепатите, ДНАН РА, 1998, т.98, 4, с.363-365.
6. Агабалян А.С., Агавелян А.М., Казарян А.В. К вопросу профилактики развития послеоперационных рецидивов и метастазов у больных колоректальным раком, Сб. науч. трудов, посв. 70-летию ЕРГМУ, Ереван, 2000, с.59-61.
7. Бдоян О.К., Едоян Л.В., Казарян А.В., Карагезян К.Г. Особенности качественно-количественных изменений фосфолипидов в эритроцитарной массе и мембранах эритроцитов белых крыс с инсулиновой гипогликемией, Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 1, с.44-47.
8. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В. Итоги науки и техники. Серия "Иммунология", М., 1988, т.22, с.6-21.
9. Бурлакова Е.Б. Вестник РАН, 1994, т.64, 5, с.425-431.
10. Дятловицкая Э.В. Влияние ганглиозидов плаценты на бласттрансформацию и Т-супрессорную активность лимфоцитов человека, Иммунология, 1990, т.14, 1, с.27-79.
11. Дятловицкая Э.В. Ганглиозиды GM₃ и GD₃ в опухолях желудка и молочной железы человека, Биохимия, 1991, т.56, 4, с.560-564.
12. Дятловицкая Э.В. Сфинголипиды и злокачественный рост, Биохимия, 1995, т.60, 6, с.843-850.
13. Дятловицкая Э.В., Андреасян Г.О., Малых Я.Н., Рылова С.Н. Шеддинг ганглиозидов и изменение биосинтеза керамидов в опухолях яичника человека, Биохимия, 1997, т. 62, 4, с.651-656.
14. Едоян А.Р. Специфика корректирующего действия сверхнизких доз факторов химической и физической природы при нарушениях метаболизма фосфолипидов у белых крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом. Автореф. дис... канд. биол. наук. Ереван, 2004, 21 с.
15. Едоян Л.В. Качественно-количественные нарушения фосфолипидов субклеточных образований гепатоцитов аллоксандиабетических белых крыс и корректирующее действие сверхнизких доз факторов химической и физической природы. Автореф. дис... канд. биол. наук, Ереван, 2004, 21 с.
16. Захарян Р.А., Месропян Н.П., Мовсисян А.В., Агабалян А.С., Аюкян Ж.И. Противоопухолевая активность Са-двуспиральной РНК из нуклеината натрия, Экспериментальная онкология, 1985, 3, с.54-56.
17. Захарян Р.А., Казарян П.А., Агабалян А.С., Карагезян К.Г. Стимуляция Са²⁺-дс-РНК синтеза цАМФ и ингибирование транскрипции гена "тус" в клетках лимфосаркомы Плиссе, ДНАН РА, 1997, т.97, 1, с.63-66.
18. Захарян Р.А., Рычков Г.Е., Дадалян С.С. и др. Действие двухцепочечной РНК на мембранные процессы пейсмекерного нейрона, Нейрохимия РАН и НАН РА, 1998, т.5, 3, с.239-246.
19. Казарян А.В. Особенности структурных изменений фосфолипидов головного мозга

- белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном, Изд. Международной конференции "Ломоносов, 2005", М., 2005, с.437-439.
20. *Казарян А.В., Овакимян С.С., Секоян Э.С., Карагезян К.Г.* Особенности антикоагулянтных свойств вновь синтезированных препаратов кумаринового ряда, ДНАН, Ереван, 2006, т.106, 1, с.72-79.
 21. *Казарян А.В.* Особенности нарушений фосфолипидного обмена, процессов свободнорадикального окисления, свертываемости крови и эффективность механизмов их корригирования при моделированном аллоксаном сахарном диабете. Автореф. дис., Ереван 2006, с. 21
 22. *Карян Ш.С.* Этиопатогенетические особенности срывов антирадикальной защиты клетки при моделировании аллоксанового диабета у белых крыс и возможные механизмы их упорядочения. Автореф. дис... канд. биол. наук, Ереван, 2003, 22 с.
 23. *Карагезян К.Г.* В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972, 267 с.
 24. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Карапетян Э.Т., Енгибарян А.А.* Способ лечения туберкулеза легких, Авторское свидетельство N1713585, Госкомизобретений СССР по науке и технике, М., 1988.
 25. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Карапетян Э.Т.* *Вопр.мед.химии*, 1989, 4, с.11-12.
 26. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д.* *Пробл.туб.*, 1990, 8, с.22-24.
 27. *Карагезян К.Г., Погосян А.Ю., Овсепян Л.М.* *Докл. РАН*, 1994, т.334, 1.
 28. *Карагезян К.Г., Мелкумян А.В., Сафарян М.Д., Карагезян М.К.* Особенности нарушений обмена фосфолипидов в молекулярных механизмах патогенеза экспериментального туберкулезного воспаления легочной ткани и формирования генерализованного гипоксического синдрома, *Вестник хирургии Армении*, 1996, 1, с.89-94.
 29. *Карагезян К.Г., Бдоян О.К., Казарян А.В., Овакимян С.С.* Специфика функциональной активности метаболизма гликогена в биологических системах белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном, *Мед. наука Армении НАН РА*, 2006, т. XLVI, 2, с.64-68.
 30. *Карагезян К.Г., Казарян А.В., Едоян Л.В., Овакимян С.С.* Молекулярные механизмы антикоагулянтного действия соединений кумариновой природы, ДНАН РА, 2006, т.106, 2, с.47-51.
 31. *Крепс Е.М.* В кн.: Липиды клеточных мембран. Л., 1981.
 32. *Крепс Е.М.* В кн.: Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира, XXII Баховские чтения, Л., 1967.
 33. *Мартиросян А.А., Казарян А.В., Секоян Э.С., Карабашян Л.В. и др.* Специфика корригирующего действия ультрафиолетового облучения при нарушениях резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу у белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном, *Аллергология и иммунология*, Афины, 2005, т. 6, 3, с.368.
 34. *Сафарян М.Д., Карагезян К.Г.* *Клин.мед.*, 1991, 7, с.31-33.
 35. *Сафарян М.Д.* Взаимосвязь течения туберкулеза легких с состоянием липидного и белкового обмена и клиническая эффективность их корреляции в процессе комплексной химиотерапии, Дис.... докт. мед. наук, М., 1992.
 36. *Сафарян М.Д., Карагезян К.Г., Карапетян Э.Т.* Способ дифференциальной диагностики туберкулеза и острой пневмонии. Авторское свидетельство N1617382, Госкомизобретений СССР по науке и технике, М., 1988.
 37. *Ghazaryan A.V., Housepyan L.M., Karageuzyan K.G.* Specificities of phospholipids' metabolism in rat brain tissue under the conditions of diabetes mellitus, modulated by alloxan, *Iranian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Iran, 2005, p.31.
 38. *Goetzl E.J., Lynch K.R.* Lysophospholipids and eicosanoids in biology and pathophysiology, *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 2002, v.905, p. 357.
 39. *Folch J., Lees M., Sloane-Stane G.* A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, p.497-509.

40. *Karegeuzyan K.G., Ktsoyan Zh.A., Ghazaryan A.V., Elbakyan G.V. et al.* Lysophosphatidilcholines of blood as a possible etiopathogenetic factor at familial Mediterranean fever (periodic disease), *International Journal on Immunorehabilitation*, Athens, 2005, 7, 2, p.102.
41. *Karageuzyan K.G., Ghazaryan A.V., Hovakimyan S.S., Karagyozyan M.K., Bdoyan O.K., Melkumyan A.V.* Peculiarities of the physiological activity of newly synthesised preparations of koumarin nature on rat brain tissue thromboplastic activity, *International Journal on Immunorehabilitation*, Tenerife, 2006, 7, 3, p.114.