

УДК 577.11.547.953.616.57.008.5

П.А. КАЗАРЯН, Л.С. СААКЯН, А.Р. ЕГИАЗАРЯН,
А.Г. ГРИГОРЯН, М.К. БЕГЛАРЯН

ВЛИЯНИЕ 4-БУТАНОЛИДОВ НА ПРОЦЕССЫ БИОСИНТЕЗА И РАСПАДА МЕМБРАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ИОНИЗИРУЮЩЕМ ОБЛУЧЕНИИ

Изучали активность отдельных ферментов биосинтеза и распада мембранных глицеролипидов в легочной ткани при ионизирующем излучении. Установлено, что облучение приводит к резкому подавлению активности глицерокиназы, цитоплазматической и митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы легких. При этом активность фосфолипазы A_2 резко увеличивается, что свидетельствует о деградации мембранных фосфатидов-глицеридов. Применение 4-бутанолидов сопровождается коррекцией глицерокиназного и гликолитического путей фосфатидогенеза в изученной ткани при ионизирующем облучении.

Несмотря на богатый арсенал противолучевых препаратов, применяемых при лучевой патологии, актуальной задачей фармакологической медицинской радиологии и фармакологии является поиск новых, более эффективных и менее токсичных средств, обладающих радиопротекторными характеристиками.

В ряду новых препаратов, прошедших лабораторные испытания на противоопухолевую активность и цитотоксичность в эксперименте, заслуживает внимание соединение ВАС-167, производное бутанолидного ряда, синтезированное на кафедре органической химии ЕГУ.

Исследовано влияние препарата на моделях опухолей (лимфолейкоз Р-388, легочная карцинома Льюиса и меланома В-16) [1]. Во всех используемых моделях наблюдалась остановка роста первичной опухоли на 59–70%. При этом ВАС-167 был наиболее эффективен при меланоме В-16 [1].

Учитывая определенные противоопухолевые свойства препарата, а также его мембраностабилизирующее воздействие на почечную ткань [2], мы предприняли специальные исследования по изучению действия 4-бутанолидов на процессы биосинтеза и распада фосфолипидов сурфактанта легкого при ионизирующем облучении.

Как известно, легкие являются одними из главных мишеней, ответственных за развитие лучевой патологии после воздействия внешних источников излучения и радионуклидов – соединений, обладающих низкой растворимостью и длительно задерживающихся в ткани легких [3, 4].

Патогенез повреждений легких при ионизирующем облучении изучен недостаточно. Экспериментальные исследования на животных показывают, что критическими клетками-мишенями в легких являются пневмоциты вто-

рого порядка, вырабатывающие поверхностно-активные вещества (сурфактанты), предотвращающие адгезию и *коллапс альвеол* при выдохе. Уменьшение содержания сурфактантов может вызвать нарушение баланса осмотического и гидростатического давлений, приводящих к накоплению жидкости в альвеолах, что является характерным признаком лучевого пневмонита [5–7].

Результаты изучения сурфактанта свидетельствуют о его сложной липидно-белково-углеводной природе, содержащей около 20 компонентов, причем наибольшей поверхностной активностью в нем обладают дипальмитоилфосфатидилхолины (ДПФХ) [8–11].

Задачей нашего исследования является изучение метаболизма фосфолипидов (ФЛ) и выявление закономерностей, проявляющихся в изменениях активности ферментных систем фосфатидогенеза и деградации ФЛ сурфактанта легких под действием препарата ВАС–167 в норме, при ионизирующем облучении и после его применения.

Материалы и методы. Исследования проводились на белых крысах – самцах линии Вистар массой 180–200 г. Животных облучали аппаратом РУМ–17 (доза составляет 3 Гр, мощность дозы – 0,26 Гр/мин, кожно-фокусное расстояние – 60 см). Препарат вводили в виде 2%-ого водного раствора внутривентриально ежедневно на 10-ые сутки после облучения животных (трое суток по одной инъекции в день) из расчета 10 мг/кг их массы.

Исследовали сурфактант легких, выделенный по методу Абрамса [12], в модификации Биркуна и соавторов [13].

Активность глицерикиназы (ГК) [КФ 2.7.1.30], α-глицерофосфатдегидрогеназы (ГФД) (КФ 1.1.1.8) в реакции окисления α-ГФ определяли по методам Кеннеди [14], а активность ГФД в реакции восстановления диоксиацетонфосфата (ДОАФ) – по Бейсенгеру и соавторов [15].

Активность фосфолипазы A_2 определяли спектрофотометрическим методом Грасса и Моэллингера [16] в модификации Казаряна [11]. Измерение активности ферментов производили в течение первых 3 мин с момента начала реакции. Ферментативную активность выражали в мкмоль никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) на 1 г свежей ткани. Цифровой материал подвергали статистической обработке с использованием критерия достоверности и различий Фишера–Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как известно, биосинтез фосфатидилхолинов (ФХ) сурфактанта осуществляется в основном двумя путями: ступенчатым метилированием фосфатидилэтаноламина (N-метилтрансферазная реакция) или взаимодействием цитидинфосфохолина с 1,2-диацилглицерином (фосфохолинтрансферазная реакция). Центральную роль в этих процессах играет фосфатидная кислота (ФК), источником которой является глицерофосфат (ГФ). ФК в митохондриях может образоваться и из дигидроксиацетонфосфата (ДОАФ). В свою очередь ГФ может образоваться активированием глицерина под действием ГК (глицерикиназный путь), и из промежуточного продукта гликолиза – ДОАФ в результате процесса его стереоспецифического восстановления L-α-ГФД (гликолитический путь). В организме установлено наличие 2 типов ГФД – растворимой (цитоплазматической) и митохондриальной (ФАД-зависимой). Цитоплазматический фермент является НАД-зависимой и катализирует реакцию превращения ДОАФ в ГФ. Митохондриальная ГФД (флавиновый фермент) катализирует реакцию окисления ГФ до ДОАФ, причем простетическая флавиновая группа фер-

мента восстанавливается. Благодаря существованию растворимой и митохондриальной форм ГФД обеспечивается функционирование глицерофосфатного челнока, осуществляющего передачу восстановленных эквивалентов от внемитохондриальных молекул НАДН₂ внутримитохондриальной цепи переноса электронов.

С учетом вышеизложенного возникает необходимость прежде всего исследовать влияние препарата ВАС-167 на ферментные системы начальных этапов синтеза ФЛ сурфактанта легких.

Результаты исследований (см. табл.) выявили определенные закономерности воздействия препарата на процессы гликолитического пути образования ГФ, в частности на активность ГФД. Резкое усиление деятельности ГФД в реакции восстановления ГФ в ДОАФ свидетельствует об активации гликолиза, с одной стороны, и глюконеогенеза – процесса синтеза глюкозы из неуглеводных предшественников – с другой.

Известно, что в нормально функционирующем организме происходит также гидролиз мембранных ФЛ фосфолипазами с высвобождением жирных кислот, в том числе и арахидоновой кислоты, являющейся исходным субстратом в синтезе простагландинов.

Полученные нами данные (см. табл.) показывают, что под действием препарата происходит заметное увеличение активности фосфолипазы А₂ (55,7%), катализирующей реакцию расщепления сложно-эфирной связи во втором положении фосфатидов глицеридов.

Активность ферментов начальных этапов биосинтеза и распада ФЛ сурфактанта легких в норме и после применения препарата ВАС-167 (в мкмоль НАДН₂ на 1г ткани)

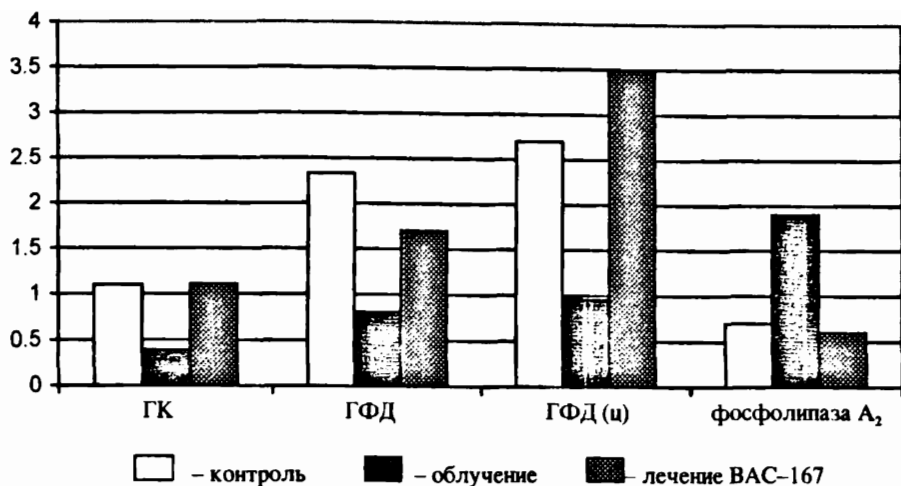
Ферменты	Контроль	Препарат ВАС-167	Изменения в %	P
ГК	1,1 ± 0,02	0,9 ± 0,01	18,2	< 0,05
ГФД(мит.)	2,33 ± 0,14	4,4 ± 0,01	88,8	< 0,001
ГФД(цит.)	2,7 ± 0,04	4,8 ± 0,02	77,8	< 0,001
фосфолипаза А ₂	0,7 ± 0,15	1,09 ± 0,2	55,7	< 0,01

Увеличение активности фосфолипазы А₂ можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию организма в ответ на действие чужеродных агентов, проявляющееся в дальнейшем активацией каскада реакций арахидоновой кислоты с вовлечением в синтез простагландинов, так называемых "медиаторов воспаления".

Вторая серия наших исследований была посвящена действию 4-бутанолитов на метаболизм ФЛ, в частности на процессы синтеза и распада ФЛ сурфактантов легких при ионизирующем облучении после применения препарата.

Ранее проведенными исследованиями [17] установлено, что ионизирующее облучение характеризуется значительным изменением глицерокиназного и гликолитического путей образования ГФ в легочной ткани (см. рис.), что, в свою очередь, приводит к нарушению деятельности глицерофосфатной "челночной" системы и подавлению процессов энергообразования [17–19]. Этим отчасти можно объяснить нарушение метаболической и дыхательной функций легких при лучевых поражениях.

Результаты действия препарата ВАС-167 на активность ферментов при ионизирующем облучении приведены на рисунке.



Активность ферментов синтеза и распада ФЛ сурфактанта легких после применения препарата ВАС-167 при ионизирующем облучении (в $\mu\text{моль НАДН}_2$ на 1 г ткани).

Согласно приведенным данным, после применения препарата наблюдается почти полная нормализация активности ГК и менее выраженная – деятельности митохондриальной ГФД. При этом активность цитоплазматической ГФД в патологически измененной легочной ткани резко (более чем в три раза) возрастает.

Одновременно под действием препарата наблюдается статистически достоверное ($p < 0.01$) уменьшение активности фосфолипазы A₂ до контрольных величин

Таким образом, применение препарата ВАС-167 при лучевом поражении приводит к определенной нормализации глицерокиназного и гликолитического путей биосинтеза ГФ, а также регуляции активности фосфолипазы A₂ в ткани легкого, что сопровождается нормализацией концентрации ГФ в этом органе в изученных состояниях организма. Усилением скорости вовлечения последнего в процессы синтеза, на наш взгляд, можно объяснить почти полное восстановление уровня липидных компонентов сурфактантов.

Отдел биохимии Гематологического центра МЗ РА, ЕГУ

Поступила 18.04.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян В.С., Кочилян Т.В., Аветисян А.А., Кинзирский – В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Ер., 1998, с. 409–412.
2. Казарян П.А., Абрамян Г.В., Арутюнян В.С., Кочилян Т.В., Егиазарян А.Р. – Биолог. ж. Армении, 1999, № 3–4 (52), с. 289–291.
3. Оганесян Н.М. – Вест. Международной АН экологии и безопасности жизнедеятельности (МАНЭБ). Санкт-Петербург, 1999, № 7(19), в. 2, с. 36–39.
4. Ярмоненко С.П. Клиническая радиобиология. М.: Медицина, 1992, 316 с.
5. Steinberg F., Rehn B., Kraus R., Quabeck K., Bruch J., Beelen D.W., Schaefer U.W., Strefli C. – Environ. Health. Perspect., 1992, № 97, p. 117.
6. Tsao C., Ward W.F., Molteni A., Taylor J.M., Tsao F.H., Annexin J. – Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997, № 56(2), p. 99–104.
7. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. М.: Медицина, 1991,

8. Down J.D. – Brit. J. Cancer, 1986, v. 53, s. 7, p. 330–332.
9. Gluck L., Motoyama E.K., Smits H.J. et al. – Pediat. Res., 1967, v.1, № 2, p. 237–246.
10. Giri P.G.S., Kimler B.F., Giri U.P., Cox G.G. – Brit. J. Cancer, 1986, v. 53, s.7, p. 324–326.
11. Казарян П.А. Обмен и взаимопревращение фосфолипидов, триглицеридов и глюкозы при хроническом воспалительном процессе: Автореф. дис. на соискание уч. ст. докт. мед. наук. Ер., Мед. ин-тут, 1986, с.286,
12. Abrams M.E. – J. App. Physiol., 1966, v. 21, № 6, p. 718–720.
13. Биркун А.А., Нестеров Е.Н., Кобозев Г.В. Сурфактанг легких. Киев, 1981, 160 с.
14. Kennedy E.P. – Methods in Enzymology, 1962, № 5, p. 476–481.
15. Beisenherz G. at al. – Methods in Enzymology, 1955, № 1, p. 391.
16. Grassl M., Moellering H. – J. Anal. Chem., 1969, v. 243, p. 416–423.
17. Казарян П.А., Саакян Л.С., Асоян А.У., Казарян В.В. – Вест. МАНЭБ, 1999, № 5(17), с. 65–68.
18. Hallman M., Gluck L. – J. Lipid res., 1976, v. 17, № 3, p. 257–262.
19. Horwood J.L., Desoi R., Hexst P. at al. – Biochem J., 1975, v. 151, № 3, p. 701–714.

Պ.Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Լ.Ս. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ա.Ռ. ԵԴԻԱԶԱՐՅԱՆ,
Ա.Գ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Մ.Կ. ԲԵԳԼԱՐՅԱՆ

4-ԲՈՒԹԱՆՈԼԻԴՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԻ ԵՎ ԶԱՅԲԱՅՄԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՅՆԵՐԻ ՎՐԱ ԻՈՆԱՅՆՈՂ ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել են թաղանթային գլիցերոլիպիդների կենսասինթեզի և քայքայման տարբեր ֆերմենտների ակտիվության փոփոխությունները իոնացնող ճառագայթման ժամանակ: Հաստատված է, որ իոնացնող ճառագայթումը հանգեցնում է գլիցերոլինազի, ցիտոպլազմային ու միտոքոնդրիալ գլիցերոֆոսֆատդեհիլոթոզենազի ակտիվության կտրուկ նվազման թրջային հյուսվածքում: Այդ պայմաններում ֆոսֆոլիպազ Ա₂-ի ակտիվությունը կտրուկ աճում է, ինչը վկայում է թաղանթային ֆոսֆատիդներ-գլիցերիդների քայքայման մասին: 4-բութանոլիդների ներարկումը ուղեկցվում է ֆոսֆատիլոթոզենեզի գլիցերոլինազային և գլիկոլիտիկ ուղիների կարգավորմամբ հետազոտվող հյուսվածքում իոնացնող ճառագայթման ժամանակ:

P.A. GHAZARIAN, L.S. SAHAKIAN, A.R. YEGHIAZARIAN,
A.G. GRIGORIAN, M.K. BEGLARIAN

EFFECT OF 4-BUTANOLIDES ON THE PROCESS OF BIOSYNTHESIS AND DECAY OF MEMBRANE GLYCEROLIPIDS AT IONIZING IRRADIATION

Summary

The activity of systems of several enzymes biosynthesis of membrane glycerolipids in lung tissues at ionizing irradiation is studied. It is revealed that irradiation brings a sharp decrease of glycerokinase and cytoplasmatic and mytochondrial glycerophosphatdehydrogenase in lungs. In those conditions, the activity of phospholipase A₂ is sharply increased in the mentioned tissue, which gives evidence about the speed of mcembrane phosphatides-glycerides degradation. The application of 4-butanolides is accompanied with processes of glicerokinases and glicolitics ways of phosphatidogeneses in the mentioned tissue during ionizing irradiation.