

УДК 576.895.577.1.595.13

**ФОСФОЛИПИДЫ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ
КРОВИ ОВЕЦ, ЗАРАЖЕННЫХ НЕМАТОДАМИ
DICTYOCAULUS FILARIA**

© А. Э. Кучбаев, Г. М. Бастарбекова

Приведены результаты анализа фосфолипидов (ФЛ) и их жирнокислотного состава (ЖК), содержащихся в крови овец, инвазированных нематодами *Dictyocaulus filaria*. Показаны значительное увеличение содержания продукта деградации фосфатидилхолина (ЛФХ), арахидоновой кислоты и снижение докозгексаеновой кислоты в ФЛ крови зараженных овец. Эти изменения свидетельствуют о структурно-функциональных нарушениях клеточных мембран при диктиокаулезе животных. Масштаб этих нарушений предлагается рассматривать как метаболический критерий для оценки взаимоотношений в системе «паразит—хозяин».

Поселение паразитов в хозяине наряду со специфичными местными тканевыми реакциями вызывает изменения в общих физиологических и биохимических реакциях хозяина. Одним из критериев оценки взаимодействия в паразито-хозяинной системе могут служить модификации фосфолипидного (ФЛ) и жирнокислотного (ЖК) составов хозяина, поскольку и ФЛ в целом, и ЖК чутко реагируют на адаптацию организма к меняющейся среде обитания (Крепс, 1981).

Настоящее исследование посвящено изучению изменений ФЛ и ЖК составов крови овец при заражении нематодами *Dictyocaulus (D.) filaria*, поселяющимися в просвете дыхательных путей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кровь здоровых и инвазированных нематодами *D. filaria* овец получали во время забоя животных на Ташкентском мясокомбинате. Экстракцию липидов из крови осуществляли по Фольчу (Folch e. a., 1957). Разделение ФЛ на индивидуальные фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей хлороформ—метанол—28 %-ный аммиак (соотношение по объему 13 : 7 : 1) (Хроматография..., 1986). Количественное содержание отдельных фракций ФЛ оценивали по методу Васьковского и др. (Vaskovsky e. a., 1975) по концентрации фосфора в снятых с пластинок зонах пятен и выражали в процентах от суммы всех фракций ФЛ.

Для определения состава фракций ЖК фосфолипиды подвергали метилированию в течение 25—30 мин метанолом, содержащим 1 %-ную серную кислоту при 80°. Сумму метиловых эфиров ЖК фосфолипидов анализировали на хроматографе ЛХМ-80. Идентификацию фракций ФЛ и их ЖК проводили с использованием стандартов методом добавки индивидуальных ЖК и сравнением с данными, имеющимися в литературе (Ланкин, Садовникова, 1971; Ивков, 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнительного изучения состава ФЛ крови здоровых и зараженных нематодами *D. filaria* овец представлены в табл. 1. Основную массу ФЛ крови здоровых овец составляет фосфатидилхолин, доля которого доходит до 60 %.* Одной из главных фракций фосфолипидов в составе тканей большинства беспозвоночных и позвоночных животных является фосфатидилэтаноламин, содержание которого колеблется в пределах 16—30 %, а в некоторых случаях и превышает эти значения (Крепс, 1981). Согласно нашим данным, его содержание в крови овец составляет 22 %. Суммарно на фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин приходится 82.7 % от общего количества ФЛ.

Общее содержание остальных идентифицированных ФЛ: кардиолипина, сфингомиелина, фосфатидилсерина и лизоформ фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина не превышает 13.3 %, что согласуется с данными по другим позвоночным животным (Котык, Яснотек, 1980; Азизов и др., 1996). Фосфатидилинозит и фосфатидная кислота в крови овец присутствуют в следовых количествах (менее 0.5 %). Наиболее характерным показателем состава ФЛ крови животных считается отношение аминсодержащих (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, лизоформа фосфатидилэтаноламина) к холинсодержащим (фосфатидилхолин, сфингомиелин, лизоформа фосфатидилхолина). Для крови здоровых овец это отношение равно 0.4.

В крови инвазированных нематодами животных обнаружено изменение количественного содержания индивидуальных фракций ФЛ. Содержание кардиолипина повышается в 1.9, фосфатидилсерина — в 1.4 раза по сравнению со здоровыми животными. В то же время доля фосфатидилхолина снижается в 1.2 раза. Существенно, в 3.4 раза возрастает количество продукта деградации (лизоформы) фосфатидилхолина. Последнее изменение на фоне снижения количества фосфатидилхолина свидетельствует об активировании фосфолипазы A_2 под влиянием инвазии. Известно, что в норме эндогенные фосфолипазы мембран участвуют в процессе адаптации организма к изменяющимся внешним условиям, а при патологии и стрессорных воздействиях способствуют образованию «скрытых» повреждений мембран (Алматов, 1993). Высокое содержание продуктов деградации фосфатидилхолина в составе ФЛ является одним из факторов, вызывающих подавление фосфорилирования, ингибирования мембрано-связанных ферментов и нарушение структурной целостности мембран (Аксенова и др., 1989; Siguroл e. a., 1989). В меньшей степени затрагивается содержание таких ФЛ, как сфингомиелин, и продуктов деградации фосфатидилэтаноламина. Сходная картина была выявлена Сидоровым и др. (1989) при изучении гельминтов рыб. Отношение аминсодержащих и холинсодержащих ФЛ в крови овец в период заражения составляет 0.6, что заметно превышает аналогичный показатель у здоровых особей.

Таким образом, заражение овец *D. filaria* вызывает существенные изменения в количественном содержании отдельных фракций ФЛ, что, в свою очередь, может привести к нарушению липид-белковых взаимоотношений в результате изменения относительного содержания амин- и холинсодержащих ФЛ и повреждению структурной целостности мембран при увеличении количества лизатов ФЛ в крови.

Результаты анализа жирнокислотного состава ФЛ крови здоровых и зараженных *D. filaria* животных методом газожидкостной хроматографии представлены в табл. 2.

Всего в ФЛ крови овец нами было идентифицировано 13 ЖК. У здоровых животных основные фракции ЖК представлены миристиновой, олеиновой, стеариновой и арахидоновой кислотами. На их долю приходится 78.6 % от суммы всех жирных кислот фосфолипидов.

Жирнокислотный состав ФЛ тканей был изучен у разных беспозвоночных и позвоночных животных (Ойматова и др., 1995; Ойматов и др., 1996). По нашим

* Здесь и далее приводится процент от суммарного содержания фосфолипидов.

ТАБЛИЦА 1

Изменение состава фосфолипидов крови овец при заражении нематодами *Dictyocaulus filaria* (% суммы ФЛ, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Table 1. Changes of phospholipid content in blood of sheep infected with the nematode *Dictyocaulus filaria*

Фосфолипидная фракция	Кровь овец	
	незараженных	зараженных
Фосфатидилхолин	60 ± 1.6	49.2 ± 1.1
Фосфатидилэтаноламин	22.7 ± 1.2	24.2 ± 0.9
Кардиолипин	3.2 ± 0.4	6.1 ± 0.7
Сфингомиелин	3.1 ± 0.3	3.7 ± 0.4
Фосфатидилсерин	5.2 ± 0.6	7.4 ± 0.6
Фосфатидилинозит	Следы	Следы
Фосфатидная кислота	»	»
Лизофосфатидилхолин	1 ± 0.2	3.7 ± 0.4
Лизофосфатидилэтаноламин	0.8 ± 0.3	1 ± 0.5
Неидентифицированные фосфолипиды	3.8 ± 0.6	4.7 ± 0.4

Примечание. Доверительные интервалы вычислялись при уровне вероятности 0.05.

ТАБЛИЦА 2

Жирнокислотный состав общих фосфолипидов крови здоровых и зараженных нематодами *Dictyocaulus filaria* ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ % от суммы всех ЖК)

Table 2. Fatty acid content of general phospholipids in blood of healthy sheep and ones infected with the nematode *Dictyocaulus filaria*

ЖК	Незараженные	Зараженные
Лауриновая (12 : 0)	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.5
Миристолеиновая (14 : 1)	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Миристиновая (14 : 0)	23.6 ± 0.8	19.6 ± 0.9
Пальмитоолеиновая (16 : 1)	1.2 ± 0.2	1 ± 0.4
Пальмитиновая (16 : 0)	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.2
Линолевая (18 : 2)	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2
Олеиновая (18 : 1)	29.2 ± 0.8	25 ± 0.7
Стеариновая (18 : 0)	18.3 ± 0.6	18.9 ± 0.4
Нонадеценивая (19 : 1)	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.2
Нонадекановая (19 : 0)	1.4 ± 0.4	0.9 ± 0.1
Арахидоновая (20 : 4)	7.5 ± 0.2	14.8 ± 0.5
Докозатетраеновая (22 : 4)	3.9 ± 0.7	8.2 ± 0.6
Докозагексаеновая (22 : 6)	6 ± 0.3	3.5 ± 0.4
Неидентифицированные ФЛ	3.6 ± 0.6	3.2 ± 0.2
Насыщенные ЖК	46 ± 0.6	42.4 ± 0.9
Ненасыщенные ЖК	51.4 ± 0.8	55.2 ± 0.7

Примечание. Первая цифра после названия кислоты означает число атомов углерода в углеводородной цепи, вторая — число двойных связей.

данным, у здоровых овец превалирует число ненасыщенных связей. В составе ЖК преобладают олеиновая, арахидоновая и докозагексаеновая кислоты, на которые в общем приходится 42 % от суммы всех ненасыщенных ЖК. Известно, что состав ЖК структурных ФЛ в значительной степени определяет функциональные свойства мембран, для которых характерно более высокое содержание полиненасыщенных ЖК (Сидоров и др., 1989). Среди полиненасыщенных ЖК крови здоровых животных в большом количестве обнаруживаются арахидоновая и докозагексаеновая кислоты (20 : 4 и 22 : 6), а сумма всех полиненасыщенных ЖК составляет более 38 % (табл. 2).

Насыщенные ЖК представлены в основном миристиновой и стеариновой кислотами, на долю которых суммарно приходится 91 % от общего количества насыщенных жирных кислот. Отношение ненасыщенных ЖК фосфолипидов к насыщенным в крови здоровых овец составляет 1.1.

У овец, зараженных *D. filaria*, качественный состав ЖК фосфолипидов крови не отличается от такового у здоровых животных, но имеют место отчетливо выраженные изменения в количественном содержании отдельных жирных кислот. Прежде всего это относится к миристиновой, олеиновой, арахидоновой, докозатетраеновой и докозагексаеновой кислотам, причем затрагивающие их изменения взаимосвязаны.

В частности, содержание миристиновой кислоты уменьшается в 1.2, олеиновой в 1.1 и докозагексаеновой в 1.7 раза. В то же время содержание самых значительных фракций ЖК — арахидоновой и докозатетраеновой увеличивается в 1.9 и 2.1 раза соответственно. Следует отметить, что в основном изменениям подвергают полиненасыщенные длинноцепочечные ЖК. Содержание короткоцепочечных ЖК, как насыщенных, так и ненасыщенных, практически остается неизменным.

В свое время было показано блокирующее действие арахидоновой кислоты на проницаемость межклеточных контактов (Хюльдер и др., 1994). В основе этого феномена, возможно, лежит прямое взаимодействие арахидоновой кислоты с контактными каналами клеток. Предполагается, что рост концентрации арахидоновой кислоты вызывает снижение внутриклеточного рН и повышение концентрации ионов кальция. Одновременно угнетается межцитоплазматический обмен низкомолекулярных веществ (ионов, метаболитов) между контактирующими клетками, что в свою очередь может рассматриваться как потенциальное нарушение механизма регуляции контактной проницаемости клеток.

Из всего богатого набора ЖК докозагексаеновая давно привлекала к себе внимание исследователей, поскольку она содержится в достаточных количествах в липидах активноподвижных животных, ведущих активный образ жизни, обладающих высоким уровнем метаболизма (Забелинский и др., 1995). В связи с этим она была названа «кислотой адаптации». Общеизвестно, что ферменты, встроенные в липидный матрикс, находятся в липидном окружении, отличном по составу от других областей мембраны. Значительную часть ЖК данных участков составляют полиненасыщенные кислоты, в частности докозагексаеновая (Забелинский и др., 1995). По-видимому, снижение концентрации докозагексаеновой кислоты может существенно изменить активность мембраносвязанных ферментов. Можно предполагать, что описанные выше изменения оказывают отрицательное влияние на жизненно важные функции крови и организма в целом.

Список литературы

- Азизов А. А., Кучбаев А. Э., Ойматов М., Азимов Д. А. Взаимосвязь липидного состава легких овец и нематоды *Dictyocaulus filaria* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1966. Т. 32, № 3. С. 371—373.
- Аксенова В. А. и др. Анализ структурных и функциональных особенностей клеточных мембран инфицированных растений в связи с их устойчивостью к фитопатогенам // Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями. Пушино, 1989. С. 126—130.
- Алматов К. Т. Ферментативные превращения фосфолипидов митохондрий. Ташкент: Университет, 1993. 30 с.

- (Васьковский В. Е., Костецкий К. Г., Васендин Д. М.) Vaskovsky V. E., Kostetsky K. G., Vasendin J. M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. 1975. Vol. 114, N 1. P. 645—647.
- Забелинский С. А., Чеботарева М. А., Бровцина Н. Б., Кривченко А. И. Об «адаптивной сигнализации» состава конформационных состояний ЖК в мембранных липидах жабр рыб // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1995. Т. 31, № 1. С. 29—37.
- Ивков К. М., Брестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982. 224 с.
- Котык Я., Яночек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980. 341 с.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 340 с.
- Ланкин В. З., Садовникова И. П. Простой количественный метод прямой переэритрофикации высших жирных кислот в биологических образцах // Вопр. мед. хим. 1971. Т. 17, вып. 3. С. 331—335.
- Ойматов М., Шакарбаев Э. Б., Заитова А. З., Азизов А. А., Тарасов В. А., Азимов Д. А. Фосфолипиды и их жирнокислотный состав гомогената печени моллюсков *Lymnaea auricularia*, инвазированных паренитами трематоды *Orientobilharzia turkestanica* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1996. Т. 32, № 3. С. 256—260.
- Ойматова Р. Х., Ойматов М. и др. Состав жирных кислот фосфолипидов митохондрий печени при гипобиозе у черепах *Testudo horsfieldi* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1995. Т. 31, № 5—6. С. 545—549.
- Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Смирнов Л. П., Гурьянова С. Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука, 1989. 152 с.
- Хроматография. Практическое приложение метода. В 2-х ч. Ч. 1 / Под ред. Э. Хефтмана. М.: Мир, 1986. 336 с.
- Хюльдер Д., Цемпель Г., Зур, Шаровская Ю. Ю., Муравьева Я. Д., Дунина-Баровская Ф. Я., Марголис Л. Б. Арахидоновая кислота обратимо блокирует высокопроницаемые межклеточные контакты // Биол. мембр. 1994. Т. 11, № 1. С. 50—61.
- Folsh J. e. a. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. Vol. 226, N 1.
- Siguro I., Jens-Kai G., Iugo R. Regulation of transmembrane ion transport by reaction products of phospholipase A₂. 1. Effects of lysophospholipids on mitochondrial Ca²⁺ transport // BBA Biomembranes. 1989. 982. N 1. P. 140—146.

Институт зоологии АН РУз,
Ташкент, 700095

Поступила 10 I 2001

PHOSPHOLIPIDS AND FATTY ACID CONTENT IN THE BLOOD
OF SHEEP INFECTED WITH THE NEMATODES *Dictyocaulus filaria*

A. E. Kuchbaev, G. M. Bastarbekova

Key words: phospholipids, fatty acids, blood, nematode infection, *Dictyocaulus filaria*.

SUMMARY

The results of analysis of phospholipids (PL) and fatty acid content in the blood of sheep infected with the nematodes *Dictyocaulus filaria* are displayed. A significant increase of lysophosphatidylcholine and arachidonic acid as well as a decrease of docozagexaenic acid in PL of infected sheep have been recorded. That points out to structural and functional disorders of cellular membranes during the infection. These disorder could be used as a metabolic criterion to estimate the relationships within the host-parasite system examined.