

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 576.8.097.29:547.953

**ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФАКТОРОВ НА
КАЧЕСТВЕННО-КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ФОСФОЛИПИДОВ В
ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЦИРРОЗЕ**

К.Г. КАРАГЕЗЯН*, А.С. МАРГАРЯН*, Л.М. ОВСЕПЯН, А.А. СИМОНЯН*,
Л.А. СИМОНЯН*, И.Г. БАТИКЯН*, Р.Б. БАДАЛЯН***

*Институт биохимии имени Г. Х. Бунятыана НАН РА, 375014, Ереван

**Институт молекулярной биологии НАН РА, 375014, Ереван

Исследовали сдвиги количественного и качественного состава кислых и нейтральных фосфолипидов (ФЛ) при CCl_4 -индуцированном циррозе в печеночной ткани белых крыс, а также протекторное действие -токоферола и тиосульфата натрия в этих изменениях. На фоне этой патологии установлены существенные количественные отклонения состава ФЛ. Заметно понижено содержание фосфатидилхолинов (-31%) и фосфатидилэтаноламиннов (-49%), а уровень лизофосфатидилхолинов, наоборот, повышен (+127%). Показана эффективность применения антиоксидантных факторов (-токоферола и тиосульфата натрия) для нормализации выявленных изменений в содержании отдельных фракций ФЛ в печеночной ткани больных животных.

Զեռագրութիւն են թրու և չեզոք ֆոսֆոլիպիդների քանակական և որակական կազմի փոփոխությունները CCl_4 -մակածած փորձարարական ցիռոզի դեպքում սպիտակ առնետների լյարդում, ինչպես նաև -տոկոֆերոլի և նատրիումի թիոսուլֆատի կարգավորիչ դերը այդ տեղաշարժերի մեջ: Ստացված տվյալները վկայում են, որ փորձարարական ցիռոզի դեպքում նշանակալիորեն ճնշվում է ֆոսֆատիդիլ խոլինի (-31%) և ֆոսֆատիդիլ էթանոլամինի (-49%) առաջացումը, իսկ լիզոֆոսֆատիդիլ խոլինի սինթեզը, ընդհակառակը, զգալիորեն աճում է (+127%): Ցույց է տրվել հակաօքսիդանտային գործոնների՝ -տոկոֆերոլի և նատրիումի թիոսուլֆատի արդյունավետությունը առանձին ֆոսֆոլիպիդային ֆրակցիաների փոխանակության նշված խանգարումների կարգավորման մեջ ցիռոզով հիվանդ կենդանիների լյարդի հյուսվածքում:

Changes of qualitative and quantitative composition of white rats hepatic tissue acid and neutral phospholipids (PhL) at CCl_4 -induced liver cirrhosis and protective action of -tocopherol and sodium thiosulfate at this pathology have been investigated. The amount of lysophosphatidylcholine (+127%) considerably increases accompanied by the decrease of phosphatidylcholine (-31%) and phosphatidylethanolamine (-49%) contents. The use of antioxidant factors (-tocopherol and sodium thiosulfate) developed a protective effect which leads to the normalization of the investigated PhL in the animals.

*Цирроз печени - антиоксидантные факторы - нейтральные фосфолипиды -
кислые фосфолипиды*

Филогенетически стабилизированный в норме статус качественного и

количественного содержания фосфолипидов (ФЛ) биологических мембран лежит в основе формирования структурно-функциональных и метаболических особенностей клетки [6]. Согласно имеющейся информации, моделирование цирроза печени индуцированным CCl_4 сопровождается чувствительными нарушениями фосфолипид-фосфолипидных (ФЛ-ФЛ) соотношений в разных тканях (головной мозг, кровь) экспериментальных белых крыс. Также выявлено, что при циррозе печени наблюдается изменение активности окислительно-восстановительных ферментов аэробного метаболизма в крови и печени. Повышение уровня липидной перекиси в печени при циррозе даст основание использовать антиоксидантные системы, ингибиторы этого процесса, в частности α -токоферол, как эффективные антистрессорные факторы [11, 16].

Суждения о метаболических нарушениях клеточных мембран в условиях изученной патологии фокусируются в основном на главном компоненте этих образований – ФЛ [6]. Поэтому едва ли можно оспаривать важное функциональное значение ФЛ в обеспечении нормального ритма метаболических превращений, ответственных за обеспечение клеточной активности в целом, ее структурных, обменных, физико-химических и функциональных особенностей.

В связи с полученными данными сформировалась идея о проведении серий исследований в печеночной ткани экспериментальных белых крыс для изучения особенностей качественно-количественных нарушений ФЛ, ФЛ-ФЛ соотношений, а также сдвигов величины отношения суммы нейтральных ФЛ (СНФЛ) – лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), сфингомиелинов (СФМ), фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) – к сумме кислых ФЛ (СКФЛ) – монофосфоинозитидов (МФИ), фосфатидилсеринов (ФС) и кардиолипинов (КЛ) при CCl_4 - индуцированном циррозе, вызванном как у контрольных животных, так и после введения им тиосульфата натрия (ТСН) и α -токоферола (ТФ). Такая постановка вопроса имела принципиально важное значение, поскольку ТСН в настоящее время отводится роль мощного синергиста гидрокси формы ТФ как единственному в проявлении антиоксидантных свойств в сложной эндогенной системе антирадикальной защиты клетки. Этот факт был зарегистрирован при многочисленных болезненных состояниях организма [4, 5, 8].

Материалы и методика. Эксперимент проводили на беспородных белых крысах – самцах, массой 180–200 г, разделенных на 6 опытных групп. Животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. В каждой из подопытных групп находилось по 6 особей. Экспериментальный цирроз печени воспроизводили по ранее описанной методике [7]. Животным опытных групп 2, 4 и 6 2 раза в неделю на протяжении 20 дней внутрибрюшинно вводили 0,3 мл 100%-ного раствора CCl_4 . Опытные группы 3 и 4 аналогичным образом получали 0,4 мг ТФ, а группы 5 и 6 – 1 мл ТСН на массу животного. Контрольные животные получали 1 мл физиологического раствора.

Экстракцию ФЛ производили методом Фолча [12] из апетоновых порошков печеночной ткани в модификации Карагезяна [3]. Полученные экстракты выпаривали под током холодного воздуха, газообразного азота или в роторном испарителе, и образовавшийся сухой остаток растворяли в небольшом объеме хлороформ-метаноловой смеси. Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом одномерной

восходящей хроматографии с использованием системы растворителей хлороформ-метанол-аммиак (65:35:5). Экстракты ацетоновых порошков наносили на пластинки из силикагеля ("Мерк", Германия). Пятна, соответствующие индивидуальным фракциям ФЛ, проявлялись в камерах, насыщенных парами йода, в виде соответствующих образований желтого цвета, идентифицированных с помощью стандартов ("Sigma", США). После элюирования подкисленным метанолом элюаты выпаривали досуха и сжигали в среде серной и азотной кислот для минерализации органического фосфора. Количество неорганического фосфора определяли по цветной реакции молибденовокислого аммония с витамином С [2]. Количество ФЛ рассчитывали в мкг минерализованного липидного фосфора на г сухого остатка исследуемого материала или на мг белка, определенного по Лоури [13], и выражали в процентах от суммы всех ФЛ (СФЛ). Полученные результаты обрабатывали статистически по t-критерию Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, приведенных в табл. I, при CCl_4 -индуцированном циррозе печени значительно изменен качественный и количественный состав нейтральных и кислых представителей ФЛ в печеночной ткани экспериментальных животных.

Цирроз печени сопровождается разнонаправленными отклонениями

Таблица I. Динамика количественных изменений индивидуальных представителей фосфолипидов в печени белых крыс при CCl_4 -индуцированном циррозе, % от их общей суммы

Показатели	Контроль	Цирроз печени CCl_4	Разница с контролем, %
Монофосфоинозитиды	10.83 ± 0.02	$14.48 \pm 0.01^*$	+34
Лизофосфатидилхолины	6.82 ± 0.02	$15.50 \pm 0.01^*$	+127
Сфингомиелины	9.56 ± 0.02	$18.25 \pm 0.01^*$	+91
Фосфатидилхолины	36.60 ± 0.02	$25.30 \pm 0.01^*$	-31
Фосфатидилсерин	6.58 ± 0.02	$6.31 \pm 0.01^*$	-4
Фосфатидилэтаноламины	22.63 ± 0.02	$11.63 \pm 0.01^*$	-49
Кардиолипиды	7.00 ± 0.02	$8.83 \pm 0.01^*$	+26
СНФЛ	75.60 ± 0.02	$70.53 \pm 0.02^*$	-7
СКФЛ	24.40 ± 0.02	$29.47 \pm 0.01^*$	+21
СНФЛ/СКФЛ	3.098	2.39	-23

Примечания: n = 6; * достоверность по отношению к контролю - $p < 0,001$.

уровня отдельных фракций КФЛ – МФИ (+34%), ФС (-4%) и КЛ (+26%). Особый интерес представляют количественные сдвиги КЛ, что имеет непосредственное отношение к процессам окисления в клетке. Наблюдающееся увеличение количества МФИ, наряду с возрастанием содержания КЛ, следует, по-видимому, расценивать как своеобразное проявление компенсаторно-приспособительной реакции организма, направленное на поддержание дыхательного потенциала клеточного аппарата, аккумуляцию и трансформацию энергии в биомембранах [9].

Патологические изменения выявлены и в НФЛ. На фоне чувствительной убыли содержания ФХ (-31%) обнаруживается адекватное возрастание количества ЛФХ (+127%), объясняемое нами как проявление повышенной активности фосфолипазы A_2 , катализирующей реакции деацилирования ФЛ-глицеридов и в первую очередь ФХ. Наблюдающееся

при этом уменьшение уровня фосфатидилэтаноламинов (-49%) интерпретируется как результат активирующихся при патологических состояниях процессов деметилирования, сопровождающихся чрезмерным возрастанием количества ФХ, интенсивно деацилирующихся под действием фосфолипазы A₂. Таким образом, содержание ФХ не только не возрастает, а наоборот, заметно убывает по сравнению с исходными величинами.

Заметно уменьшается СНФЛ при параллельно наблюдающемся возрастании процентного содержания СКФЛ в общей СФЛ, что находит отражение на величине СНФЛ/СКФЛ, резко уменьшающейся при данной патологии.

Последующее развитие исследований протекало в направлении изучения эффектов ТФ и ТСН на метаболизм ФЛ печеночной ткани интактных белых крыс. Как видно из данных табл. 2, ТФ и ТСН отдельно не вызывают существенных отклонений в метаболизме ФЛ, но эти незначительные отклонения в СНФЛ и СКФЛ влияют на величину СНФЛ/СКФЛ.

Таблица 2. Динамика количественных изменений индивидуальных представителей фосфолипидов в печени белых крыс под действием ТФ и ТСН, % от их общей суммы

Показатели	Контроль	ТФ	ТСН
Монофосфоинозитиды	10.83 ± 0.02	9.87 ± 0.03*	10.30 ± 0.02*
Лизофосфатидилхолины	6.82 ± 0.02	7.00 ± 0.01*	7.65 ± 0.03*
Сфингомиелины	9.56 ± 0.02	10.25 ± 0.03*	10.00 ± 0.02*
Фосфатидилхолины	36.60 ± 0.02	37.50 ± 0.03*	35.80 ± 0.01*
Фосфатидилсерины	6.58 ± 0.02	7.20 ± 0.02*	7.63 ± 0.01*
Фосфатидилэтаноламины	22.63 ± 0.02	21.50 ± 0.01*	20.85 ± 0.03*
Кардиолипиды	7.00 ± 0.02	6.68 ± 0.01*	7.77 ± 0.03*
СНФЛ	75.60 ± 0.02	76.25 ± 0.01*	74.30 ± 0.02*
СКФЛ	24.40 ± 0.02	23.75 ± 0.03*	25.70 ± 0.01*
СНФЛ/СКФЛ	3.098	3.21	2.89

Примечания: n = 6; * достоверность по отношению к контролю - p<0,001.

Дальнейшие исследования проводили для выявления истинной роли примененных нами ТФ и ТСН как факторов антиоксидантного действия при CCl₄-индуцированном циррозе. Результаты этих исследований, отраженные в табл. 3, свидетельствуют об исключительно важном мобилизирующем влиянии ТФ и его синергиста ТСН на соответствующие системы эндогенной антирадикальной защиты клетки. Они предотвращают и нивелируют метаболические расстройства ФЛ, вызванные индуцированием CCl₄. Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными [14, 15, 17].

Описанные сдвиги, приведенные в табл. 1, 2 и 3, подтверждают необходимость максимального поддержания высокого уровня мобилизованности эндогенной системы антирадикальной защиты клетки. Обобщение полученных результатов служит основанием для расширения фундаментальных исследований и поиска наиболее эффективных средств химической и физической природы, способных к поддержанию существующего в норме, но весьма лабильного

Таблица 3. Количественные изменения индивидуальных представителей фосфолипидов в печени крыс при введении ТФ и ТСН на фоне цирроза, % от общей суммы

Показатели	Цирроз печени CCl ₄	ТФ + CCl ₄	ТСН + CCl ₄
Монофосфоинозитиды	14.48 ± 0.01*	11.87 ± 0.03**	12.28 ± 0.02**
Лизофосфатидилхолины	15.50 ± 0.01*	8.60 ± 0.02**	9.34 ± 0.03**
Сфингомиелины	18.25 ± 0.01*	11.60 ± 0.03**	12.63 ± 0.03**
Фосфатидилхолины	25.30 ± 0.01*	36.70 ± 0.03**	32.78 ± 0.01**
Фосфатидилсерины	6.31 ± 0.01*	7.00 ± 0.01**	8.82 ± 0.03**
Фосфатидилэтаноламины	11.63 ± 0.01*	17.60 ± 0.02**	16.25 ± 0.03**
Кардиолипины	8.83 ± 0.01*	6.63 ± 0.02**	7.95 ± 0.02**
СНФЛ	70.53 ± 0.02*	64.50 ± 0.03**	71.00 ± 0.03**
СКФЛ	29.47 ± 0.01*	25.50 ± 0.03**	29.00 ± 0.01**
СНФЛ/СКФЛ	2.39	2.53	2.44

Примечания: n = 6; * достоверность по отношению к контролю - p < 0,001; ** достоверность по отношению к результатам соответствующей группы (CCl₄) - p₁ < 0,001

динамического равновесия между системами про- и антиоксидантного действия, а также способствующие коррекции патологических сдвигов количественного и качественного состава ФЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине., М., 1967.
2. Зубер В. Л. Методы биохимических исследований., Л., 74-87, 1982.
3. Карагезян К.Г. Роль фосфолипидов в жизнедеятельности организма., Ереван, 267, 1972.
4. Карагезян М.К., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Докл. РАН, 341, 3, 408-411, 1995.
5. Карагезян К. Г. Лаб. дело. 1, 3-6, 1969.
6. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран., Л., Наука, 1981.
7. Маргарян А. С., Симомян А. А., Симомян М. А., Аветисян А. А. Докл. НАН РА, 104, 2, 130-135, 2004.
8. Менджерский А. М., Лысенко А. В., Демьяненко С. В. и др. Нейрохимия, 20, 4, 281-286, 2003.
9. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах., М., 1972.
10. Angelico M., alvaro D., Catafora A. et al. Gastroenterology, 101, 1, 228-237, 1991.
11. Fields M., Lewis C. G. Ann. Clin. Biochem., 13, 656-663, 1997.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stane G. J. Biol. Chem., 226, 497-509, 1957.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L et al. J. Biol Chem., 193, 1, 265-275, 1951.
14. Muriel P., Mourelle M. J. Hepatol., 14, 1, 16-21, 1992.
15. Nava-Ocamp A. A., Suster S., Muriel P. Eur. J. Clin. Invest., 27, 1, 77-84, 1997.
16. Noguchi N., Gotoh N., Niki E. Biofactors., 7, 41-50, 1998.
17. Rahman M. M., Suzuki M., Unno M. et al. Surg. Today., 29, 10, 1047-1052, 1999.

Поступила 18.V.2005