

УДК 576.8.097.29+547.953

А. С. Маргарян¹, академик К. Г. Карагезян², Л. М. Овсепян², А. А. Симонян¹

Специфические нарушения метаболизма фосфолипидов в тканях белых крыс при циррозе печени

(Представлено 21/VII 2005)

Ключевые слова: цирроз, фосфолипиды, антиоксиданты, перекисное окисление

В последние годы значительная роль в патогенезе метаболических и структурных состояний при целом ряде патологий отводится интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах и мембранах субклеточных структур [1, 2]. Избыточное накопление продуктов ПОЛ может служить причиной некроза клеток, нарушения физико-химических свойств их мембран, образования в них ионных каналов. ПОЛ-зависимые изменения каталитических свойств мембранно-связанных ферментов обычно обуславливаются изменением состояния и состава фосфолипидного компонента мембраны, модификацией белковых молекул фермента за счет окисления тиоловых групп взаимодействием продуктов ПОЛ со свободными аминокгруппами белков [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение интенсивности процесса ПОЛ, качественного и количественного изменения содержания фосфолипидов в крови, мозге и печени крыс при CCl_4 - индуцированном циррозе и корректирующее воздействие на эти процессы антиоксидантных факторов - α -токоферола (ТФ) и тиосульфата натрия (ТСН).

Опыты были поставлены на 30 беспородных белых крысах-самцах массой 150-200 г. Цирроз печени вызывали введением внутрибрюшинно (в/б) CCl_4 в дозе 0.15 мг/100 г веса два раза в неделю в течение 20-и дней. Животные были разделены на 6 групп (по 5 в каждой): 1) интактные; 2) с экспериментальным CCl_4 -индуцированным циррозом; 3) интактные, которым в/б вводили ТФ в дозе 1 мг/100 г веса; 4) с циррозом, которым в/б вводили ТФ в дозе 1 мг/100 г веса; 5) интактные, которым в/б вводили ТСН в дозе 0,15 мг/100 г; 6) с циррозом, которым в/б вводили ТСН.

Во всех вариантах животным ТФ и ТСН вводили 2 раза в неделю в течение 20-и дней.

Об активности перекисного окисления судили по образованию малонового диальдегида (МДА); регистрацию проводили спектрофотометрически при длине волны 535 нм [4].

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием смеси растворителей хлороформ:метанол:аммиак 65:35:5. Фосфолипидные пятна идентифицировали с помощью стандартов фирмы "Sigma" (США). Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом количества неорганического фосфора, определяемого по цветной реакции молибденовокислого аммония с витамином С [5]. Белок определяли по

Лоури и соавт. [6]. Полученные результаты были обработаны методом вариационной статистики по t-критерию Стьюдента.

Таблица 1

Изменения интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов (в нМ МДА/мг белка) в крови, головном мозге и печени белых крыс при CCl_4 -индуцированном циррозе печени под воздействием ТФ и ТСН

Исследуемая ткань	Контроль	CCl_4	ТФ	$\text{CCl}_4 + \text{ТФ}$	ТСН	$\text{CCl}_4 + \text{ТСН}$
Кровь	5.50±0.002	9.24±0.002 $P^* < 0.001$ +68%***	5.23±0.009 $P^* < 0.001$	6.83±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -26%****	6.12±0.01 $P^* < 0.001$	7.22±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -22%****
Мозг	7.00±0.002	8.21±0.002 $P^* < 0.001$ +17%***	6.33±0.009 $P^* < 0.001$	6.78±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -17%****	6.53±0.01 $P^* < 0.001$	7.12±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -13%****
Печень	6.32±0.002	15.85±0.002 $P^* < 0.001$ +151%***	5.25±0.009 $P^* < 0.001$	9.64±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -39%****	6.31±0.01 $P^* < 0.001$	10.28±0.002 $P_1^{**} < 0.001$ -35%****

*P - в сравнении с контролем; ** P_1 - в сравнении с группой, получившей CCl_4 ; *** (+ -) - изменение интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов в сравнении с контролем; **** (+ -) - изменение интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов в сравнении с группой, получившей CCl_4 .

Как показали результаты исследования (табл. 1), экспериментальный цирроз печени сопровождается накоплением большого количества перекисей липидов в крови.

Содержание МДА в контрольной группе животных - 5.5, 7.0 и 6.32 нмоль/мг белка в крови, мозге и печени соответственно, а при CCl_4 -индуцированном циррозе - 9.24, 8.21 и 15.85 нмоль/мг белка. Механизм токсического действия CCl_4 , по всей видимости, связан с его повреждающим действием через образование свободных радикалов, таких как $\text{CCl}_3^\bullet$ и $\text{Cl}^\bullet$. Свободные радикалы индуцируют развитие свободнорадикального окисления с последующим повреждением мембран эритроцитов. Повышенное образование продуктов ПОЛ инициирует окисление ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах (ФЛ). Исходя из этого нами проведена серия исследований по изучению содержания фосфолипидов в крови крыс с циррозом печени.

Как показали результаты исследования (табл. 2), CCl_4 -индуцируемый цирроз

сопровождается увеличением содержания лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), сфингомиелинов (СФМ), кардиолипинов (КЛ) с параллельным уменьшением содержания монофосфоинозитидов (МФИ), фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидилсеринов (ФС), фосфатидилэтаноламинов (ФЭ).

Функциональная роль ЛФХ зависит от уровня содержания этих ФЛ в тканях. При повышенных концентрациях ЛФХ проявляют мембранотоксический и мембранолитический эффекты, а именно вызывают перестройку липидного бислоя, приводящую к появлению неспецифической проницаемости мембран. Увеличение количества ЛФХ связано с уменьшением количества ФХ, ФС, ФЭ, т. е. именно тех ФЛ, которые легко подвергаются окислению свободными радикалами при усилении процесса перекисного окисления липидов. Увеличение содержания ЛФХ может быть также результатом повышения активности фосфолипазы A_2 , отщепляющей ненасыщенную жирную кислоту во втором положении молекулы указанных ФЛ.

Особый интерес вызывает увеличение содержания СФМ при циррозе. Как известно, в молекуле СФМ присутствуют в основном остатки насыщенных жирных кислот и поэтому повышение содержания этих липидов приводит к увеличению вязкости липидной фазы мембран, их выраженной жесткости. Известно, что жидкость липидной фазы биологических мембран является существенным фактором регуляции внутриклеточных процессов, характеризующихся в частности угнетением активности Na, K -АТФ-5 нуклеотидазы [7]. Не исключено, что одной из причин нарушения активности фермента при циррозе является повышение жесткости липидного слоя мембраны.

Заслуживает внимания факт увеличения содержания КЛ. Являясь носителями отрицательного заряда, КЛ способны выполнять ионофорную функцию, в частности, влиять на транспорт ионов Ca и Na .

Таблица 2

Содержание индивидуальных представителей фосфолипидов (в % от общей суммы) в крови при CCl_4 -индуцированном циррозе печени под воздействием ТФ и ТСН

Фракции фосфолипидов	Контроль	CCl_4	ТФ	CCl_4 + ТФ	ТСН	CCl_4 + ТСН
МФИ	8.20 ± 0.03	5.06 ± 0.01 $P^* < 0.001$ - 38%***	7.28 ± 0.02 $P^* < 0.001$	6.73 ± 0.03 $P_1^{**} < 0.001$ +33%****	7.25 ± 0.02 P^* < 0.001	7.26 ± 0.02 $P_1^{**} < 0.001$ +44%****
ЛФХ	5.30 ± 0.02	12.58 ± 0.02 $P^* < 0.001$ +137%***	4.74 ± 0.01 $P^* < 0.001$	6.32 ± 0.01 $P_1^{**} < 0.001$ -50%****	5.26 ± 0.03 P^* < 0.001	7.67 ± 0.03 $P_1^{**} < 0.001$ - 40%

СФМ	24.80±0.03	29.83±0.03 P* < 0.001 +20%***	23.72±0.01 P* < 0.001	27.62±0.01 P ₁ ** < 0.001 -39%****	23.23±0.02 P* < 0.001	25.45±0.02 P ₁ ** < 0.001 - 15%****
ФХ	40.30±0.03	30.52±0.03 P* < 0.001 - 24%***	40.83±0.02 P* < 0.001	36.31±0.02 P ₁ ** < 0.001 +19%****	42.58±0.01 P* < 0.001	34.42±0.01 P ₁ ** < 0.001 +13%****
ФС	8.20±0.01	6.15±0.01 P* < 0.001 - 25%***	9.02±0.02 P* < 0.001	7.52±0.02 P ₁ ** < 0.001 +22%****	7.71±0.03 P* < 0.001	8.19±0.01 P ₁ ** < 0.001 +33%****
ФЭ	7.30±0.02	5.60±0.02 P* < 0.001 - 23%***	8.21±0.03 P* < 0.001	8.22±0.03 P ₁ ** < 0.001 +47%****	7.72±0.01 P* < 0.001	9.63±0.03 P ₁ ** < 0.001 +72%****
КЛ	6.80±0.02	10.26±0.02 P* < 0.001 +51%***	6.20±0.01 P* < 0.001	7.36±0.01 P ₁ ** < 0.001 -28%****	7.26±0.03 P* < 0.001	7.46±0.02 P ₁ ** < 0.001 - 27%****

* Р - в сравнении с контролем; ** Р₁ - в сравнении с группой, получившей ССl₄; *** (+ -) - изменение содержания индивидуальных представителей фосфолипидов в крови в сравнении с контролем; **** (+ -) - изменение содержания индивидуальных представителей фосфолипидов в крови в сравнении с группой, получившей ССl₄.

Срывы нормального фона ФЛ-соотношений проявились в снижении относительного содержания МФИ, относящихся к категории кислых фосфолипидов. Они участвуют в так называемом фосфатозитидном цикле [8]. Благодаря наличию диссоциированных фосфатидных групп инозитидфосфолипиды обладают анионным и гидрофильным свойствами, что позволяет им в силу своей электроотрицательности влиять на общий заряд мембран клеток. Полученный нами фактический материал проливает свет на патогенетическую взаимозависимость дисбаланса ФЛ от степени их пероксидации.

В последние годы все больше внимания уделяется вопросам антиоксидантной коррекции этих повреждений [9, 10]. В качестве антиоксидантной терапии нами были выбраны ТФ и ТСН. Как показали результаты исследований, введение указанных препаратов крысам приводит к нормализации количеств перекисей, приближая их к показателям контрольных животных. Механизм действия ТФ сводится к тому, что он гасит свободные радикалы окисленных полиненасыщенных жирных кислот, являясь ловушкой для радикалов, т. е. перехватывает свободный электрон, образуя неактивное соединение. Положительное влияние указанных веществ прослеживается и при исследовании фосфолипидного состава крови при ССl₄-индуцированном циррозе печени. ТСН и ТФ оказывают заметное действие на нормализацию уровней основных фракций ФЛ. Введение ТФ и ТСН приводит к снижению

количеств ЛФХ и увеличению содержания ФХ, ФС, ФЭ, липидов, которые являются основными носителями ненасыщенных жирных кислот во втором положении молекулы указанных ФЛ.

Таким образом результаты проведенных исследований свидетельствуют о повышении уровня свободнорадикального окисления липидов и нарушении постоянства ФЛ-ФЛ соотношений при CCl_4 -индуцированном циррозе. Применение препаратов антиоксидантного действия - ТФ и ТСН оказывает протекторное действие, нормализуя количество перекисей и фосфолипидного состава в исследуемых биологических системах.

¹ Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

² Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. Бурлакова Е. Б. В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М. Наука. 1981. С. 23-26.
2. Осипов А. Н., Азизов О. А., Владимиров Ю. А. - Успехи биологической химии. 1990. Т. 31. С. 180-208.
3. Halliwell B. - Free. Radic. Res. 1999. V. 31. P. 261-272.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. В кн.: Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. "Наука". 1982. С. 223-227.
5. Зубер В. Л. В кн.: Методы биохимических исследований. Л. 1982. С. 74-87.
6. Lowry O. H., Rosenbrough J. et al. - Biol. Chem. 1951. V. 193 (1). P. 265-275.
7. Дятловицкая Э. В. - Биохимия. 1995. Т. 60 (6). С. 843-850.
8. Левицкий Д. О. Биохимия мембран. Кальций и биологические мембраны. М. 1990. 125 с.
9. Cedillo A., Mourelle M., Muriel P. - J. Pharmacol. Toxicol. 1996. V. 79(5). P. 241-246.
10. Nava-Ocampo AA., Suster S., Muriel P. - Eur. J. Clin. Invest. 1997. V. 27(1). P. 77-84.

Ա. Ս. Մարգարյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան, Լ. Մ. Հովսեփյան,
Ա. Ա. Միմոնյան

**Ֆոսֆոլիպիդների նյութափոխանակության բնորոշ խանգարումները սպիտակ
առնետների հյուսվածքներում լյարդի ցիրոզի դեպքում**

Ցույց է տրված, որ սպիտակ առնետների մոտ CCL_4 -ով ինդուկցված փորձարարական ցիրոզի դեպքում էրիթրոցիտներում, ուղեղում և լյարդում բարձրանում է լիպիդների ազատռադիկալային օքսիդացման մակարդակը և խանգարվում է ֆոսֆոլիպիդ-ֆոսֆոլիպիդ փոխհարաբերության կայունությունը: Հակաօքսիդանտային պատրաստուկների՝ α -տոկոֆերոլի և նատրիումի թիոսուլֆատի ներարկումը կենդանիներին դրսևորում է պաշտպանիչ ազդեցություն, որը և հանգեցնում է արյան պերօքսիդների քանակի և ֆոսֆոլիպիդային կազմի նորմալացման:

A.S. Margaryan, L.M. Hovsepyan, academician K.G. Karagiosyan, A.A. Simonyan

Specific Breaches of Phospholipids Metabolism at Liver Cirrhosis of White Rats

It was shown that the level of lipid freeradical oxidation was enhanced during the experimental cirrhosis induced by CCL_4 in white rat erythrocytes, brain and liver. Simultaneously the stability of the ratio of phospholipid - phospholipid was breached. The injection of antioxidant compounds α -tocopherole and sodium thiosulfate developed a protective effect which leads to the normalization of blood peroxide content and phospholipid composition of the animals.