

УДК 577.153.+616.36+455.625

О. К. Бдоян, Л. Л. Данилова, Г. В. Элбакян, академик К. Г. Карагезян

**Характеристика структурно-метаболических нарушений
мембраносвязанных фосфолипидов при оксидативном стрессе,
индуцированном адреналиновой гипергликемией**

(Представлено 4/IX 2006)

Ключевые слова: *фосфолипиды, свободнорадикальное окисление, мембраны, эритроцитов, гипергликемия*

Исследованиями последних лет [1-9] по экспериментальному сахарному диабету (СД), моделированному аллоксаном, выявлен ряд принципиально новых особенностей в расстройствах реакций тканевого метаболизма фосфолипидов (ФЛ), ФЛ-ФЛ соотношений и интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления (СРО) липидов, имеющих существенное значение в регуляции филогенетически запрограммированного статуса клеточной активности [10,11].

Целью настоящей работы является изучение особенностей нарушений метаболизма ФЛ в мембранах эритроцитов (МЭ) белых крыс как наиболее приближенного прототипа мембранных образований тканей различных уровней дифференциации в отдельные периоды развития гипергликемии, индуцированной адреналином.

Исследования проводили на 126 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в ординарных условиях вивариях и голодавших перед началом экспериментов в течение 12 ч. Внутривенное введение адреналина в количестве 2.5 мкг/100 г массы тела производили проколом кожи шприцем по биссектрисе угла венозного расширения, образованного верхней полую и подключичной венами при крестообразной фиксации белых крыс на станках для мелких животных. Забор крови в объеме 2 мл производили из указанной области через 15, 30, 45 и 60 мин после внутривенной инъекции адреналина.

МЭ выделяли по методу, описанному Лимбер [12]. К 4.5 мл крови прибавляли 0.5 мл 1.5%-ного раствора оксалата натрия, тщательно перемешивали, центрифугировали 15 мин при 1000 g на рефрижераторной центрифуге К-23. Плазму сливали, осадок - эритроцитарную массу дважды промывали изотоническим раствором NaCl с последующим центрифугированием. Отмытую эритроцитарную массу суспендировали в буферном растворе (0.01 M NaHCO₃, 0.003 M NaCl) с ЭДТА в соотношении 1:5, смесь центрифугировали при 12000 g на рефрижераторной центрифуге К-24 в течение 40 мин. Надосадочную жидкость сливали и осадок дважды промывали буфером без ЭДТА, центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин. Процедуру повторяли два раза, последний раз с использованием буфера трис-HCl, pH 7.2.

МЭ переносили в фарфоровую ступку, добавляли 15-20 мл ацетона, содержимое тщательно растирали с помощью пестика и сушили под током холодного воздуха до образования сухого

остатка [13]. Экстракцию ФЛ и их количественное определение производили по Фолчу [14]. Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом одномерной восходящей тонкослойной хроматографии с использованием системы растворителей хлороформ-метанол-аммиак (65:35:5). Экстракты ацетоновых порошков наносили на пластины в трех точках, удаленных от нижнего края пластины на 2 см. Пластины высушивали на воздухе и окрашивали в парах йода. Пятна ФЛ идентифицировали с помощью соответствующих стандартных свидетелей (Sigma). После элюирования подкисленным метанолом элюаты выпаривали досуха и сжигали в среде серной и азотной кислот для минерализации органического фосфора, количественное определение которого основано на измерении оптической плотности синего окрашивания, развивающегося в результате инкубирования его в присутствии молибденовокислого аммония и витамина С при 37°C в течение 1.5 ч. После охлаждения пробы фотометрировали на СФ-26 при длине волны 830 нм [15].

Как вытекает из данных, отраженных в табл. 1, по истечении 60 мин после инъекции адреналина развитие гипергликемической реакции организма характеризуется ярко выраженными качественно-количественными нарушениями ФЛ всех категорий. Наиболее демонстративными при этом представляются уменьшение содержания фосфатидилхолинов (ФХ) и параллельно развивающееся возрастание уровня лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), указывающие на интенсивность протекания реакций деацилирования ФХ, катализируемых воздействием чрезмерно активировавшейся фосфолипазы A_2 (ФЛазы A_2).

Таблица 1

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора /мл мембран эритроцитов) в мембранах эритроцитов белых крыс через 15 (1), 30 (2), 45 (3) и 60 (4) мин после введения адреналина

Фракции фосфолипидов	Контроль	Адреналин			
		1	2	3	4
Лизофосфати- дилхолины	3.0±0.4	3.9±0.1 ^x	4.1±0.2 ^x	4.3±0.1 ^x	16.9±0.1 ^x
Монофосфои- нозитиды	5.0±0.4	6.5±0.7 ^x	7.9±0.5 ^x	8.5±0.6 ^x	9.7±0.8 ^x
Сфингомиелины	26.7±1.1	23.7±0.9 ^{xx}	20.6±1.1 ^x	18.9±1.2 ^x	16.9±1.0 ^x
Фосфатидилхолины	39.3±1.21	33.2±1.0 ^{xx}	30.0±1.1 ^{xx}	26.2±1.1 ^x	24.7±1.2 ^x
Фосфатидилсерины	11.9±0.6	10.1±0.4 ^{xx}	8.8±0.5 ^x	7.9±0.5 ^x	7.0±0.5 ^x
Фосфатидилэта- ноламины	7.9±0.4	8.5±0.6 ^{xxx}	9.3±0.4 ^x	10.6±0.6 ^x	10.8±0.5 ^x
СФЛ	95.0±1.6	85.9±1.5 ^{xxx}	80.7±1.2 ^x	75.9±1.4 ^x	86.0±1.0 ^x

СНФЛ	77.2±1.3	69.3±1.3 ^{xxx}	64.0±1.4 ^{xx}	59.5±1.4 ^x	69.5±1.3 ^x
СКФЛ	17.8±0.6	16.6±0.6 ^x	16.7±0.5 ^x	16.7±0.5 ^x	16.7±0.6 ^x
К СНФЛ/СКФЛ	4.3±0.06	4.3±0.06 ^x	3.8±0.05 ^x	3.6±0.05 ^x	4.1±0.04 ^x

Примечания: n=28; x-P < 0.001; xx-P < 0.01.

Максимальным антиоксидантным действием обладает тиосульфат натрия (ТСН), молекулярный механизм детоксицирующего действия которого обусловлен инактивированием ФЛазы A_2 , обладающей, как известно, мощным катализирующим действием на процесс деацелирования ФХ в различных биологических образованиях, в частности в МЭ. Образующиеся в результате большие количества ЛФХ (или лизолецитинов) выступают в роли стимуляторов массового гемолиза с формированием необратимого гипоксического синдрома с летальным исходом. Обладая ярко выраженным антигемолитическим действием, ТСН проявляет также мощную антирадиационную активность путем превентирования процесса окисления структурных белков, их сульфгидрильных групп, комплексообразование которых с ДНК сопровождается формированием систем, не поддающихся разрушительному действию радиационного фактора.

Приведенные примеры антирадикального, антитоксического и стимулирующего действия ТСН на репарационные процессы при различных отклонениях нормального функционирования многочисленных биологических систем организма на клеточном, субклеточном, мембранном и молекулярном уровнях ставят ТСН в ряд наиболее эффективных терапевтических средств.

ТСН не вызывал сколько-нибудь заметных отклонений в динамике количественных изменений изученных фракций ФЛ в МЭ, что явилось свидетельством его стабилизирующего действия на регуляторные механизмы, нормализующие качественно-количественный уровень исследованных соединений, характерный для нормально метаболизирующих эритроцитов крови (табл.2).

Таблица 2

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора /мл мембран эритроцитов) в мембранах эритроцитов белых крыс через 15 (1), 30 (2), 45 (3) и 60 (4) мин после однократной внутривенной инъекции 1 мл сверхнизких концентраций (10^{-4} М, 10^{-8} М, 10^{-12} М - усредненные данные) тиосульфата натрия спустя 2 ч после его введения

Фракции фосфолипидов	Контроль	1	2	3	4
Лизофосфати- дилхолины	3.5±0.4	3.7±0.4	3.7±0.4	3.2±0.4	3.6±0.4

Монофосфоино- зитиды	4.9±0.3	5.1±0.5	5.1±0.3	5.3±0.4	5.3±0.4
Свингомиелины	26.9±0.4	27.1±0.5	27.2±0.4	27.3±0.5	27.5±0.5
Фосфатидилхолины	38.7±1.2	38.6±0.6	38.9±0.7	40.3±0.8	41.0±0.8
Фосфатидилсерины	12.5±0.6	12.7±0.7	12.7±0.6	12.9±0.6	12.8±0.7
Фосфатидилэ- таноламины	7.1±0.4	7.3±0.4	7.3±0.4	7.4±0.4	7.5±0.4
СФЛ	96.3±1.8	94.4±1.8	94.8±1.2	97.1±2.0	97.7±2.0
СНФЛ	76.2±1.3	76.7±1.3	77.0±1.3	78.9±1.4	79.6±1.4
СКФЛ	17.4±0.7	17.4±0.3	17.8±0.7	18.2±0.7	18.1±0.7
К СНФЛ/СКФЛ	4.3±0.1	4.3±0.11 ^x	4.3±0.11 ^x	4.3±0.19 ^x	4.40±0.11 ^x

Примечания: n=35; обозначения те же, что и в табл. 1, без обозначений расхождения от контроля статистически не достоверны.

Таким образом, изолированное введение ТСН не сопровождается статистически достоверными изменениями характеристик изученных показателей, что служит доказательством его общестабилизирующего действия.

Изучение особенностей 2-часового действия использованных разновидностей сверхнизких доз ТСН на фоне стабилизированной 60-минутной гипергликемии, моделированной адреналином, позволило прийти к заключению о неоднотипности проявления антиокислительной активности этого соединения применительно к отдельным представителям ФЛ в МЭ. Отмечающаяся в целом отчетливо проявляющаяся тенденция к упорядочению количественного содержания всех фракций ФЛ в отдельности и в изученных суммарных выражениях не характеризовалась, тем не менее, их полнейшей нормализацией (табл. 3). Отмеченный разнотип, выразившийся в разнонаправленности количественных сдвигов нейтральных и кислых ФЛ (НФЛ и КФЛ соответственно), не отразившийся в конечном счете на сумме ФЛ (СФЛ), расценивается как одно из частных проявлений среди многочисленных компенсаторно-приспособительных реакций организма, которое имеет, несомненно, важное значение в поддержании и стимулировании физиологического стереотипа деятельности данной биологической системы. Вместе с тем нельзя обойти вниманием факт продолжающейся убыли содержания ФХ и отмечающегося на этом фоне одновременного, более чем 5-кратного количественного доминирования ЛФХ над величиной одноименного показателя в контроле. Несмотря на отсутствие статистически достоверных расхождений в величинах СФЛ, СНФЛ, СКФЛ незначительные их отклонения от контрольных уровней оставляют, тем не менее, свой след на величине коэффициента (К) СНФЛ/СКФЛ.

Особенности количественных сдвигов ФЛ всех категорий при предварительной сенсibilизации организма введением 1 мл ТСН в концентрации 10^{-12} М и выработанной на этом фоне 60-минутной гипергликемии, моделированной адреналином, приведены в табл. 4.

Таблица 3

Особенности 2-часового действия сверхнизких доз тиосульфата натрия при нарушениях количественного содержания представителей нейтральных (НФЛ) и кислых (КФЛ) фосфолипидов, их суммы (СНФЛ и СКФЛ соответственно), а также коэффициента СНФЛ/СКФЛ (в %) в мембранах эритроцитов крови белых крыс с моделированной адреналином 60-минутной гипергликемией

Фракции фосфолипидов	Контроль	Адреналин	Тиосульфат натрия 10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁸ М	(1.0 мл) 10 ⁻¹² М
Лизофосфати- дилхолины	3.0±0.4	16.9±1.0 ^x	16.6±0.9 ^x	16.4±0.9 ^x	16.7±1.0 ^x
Монофосфои- нозитиды	5.0±0.4	9.7±0.8 ^x	8.8±0.7 ^x	6.8±0.8 ^{xx}	5.6±0.5
Сфингомиелины	26.7±1.1	16.9±1.0 ^x	19.9±1.1 ^{xx}	23.4±1.0 ^x	26.4±1.1
Фосфатидилхолины	39.3±1.2	24.7±1.2 ^x	25.8±1.0 ^x	26.1±1.1 ^x	27.5±1.0 ^x
Фосфатидилсерины	11.9±0.6	7.0±0.5 ^x	8.1±0.5 ^{xx}	9.7±0.6 ^{xx}	11.2±0.5
Фосфатидилэ- ноламины	7.9±0.4	10.8±0.5 ^x	9.9±0.5 ^{xx}	8.8±0.4 ^{xx}	8.1±0.5
СФЛ	95.0±1.2	86.0±1.0 ^x	88.4±1.0 ^{xx}	91.3±1.0	95.2±1.0
СНФЛ	77.2±1.0	69.3±1.3 ^x	71.5±1.0 ^{xx}	74.7±0.9 ^{xx}	78.4±0.9 ^x
СКФЛ	17.8±0.6	16.7±0.6 ^x	16.9±0.6 ^x	16.6±0.5 ^x	16.8±0.6
К СНФЛ/СКФЛ	4.3±0.1	4.1±0.04 ^x	4.2±0.04 ^x	4.5±0.05 ^x	4.7±0.05 ^x

Примечания: n=28, x-P < 0.001, xx-P < 0.01; без обозначений расхождения статистически не достоверны

ТСН, заранее введенный в организм в отмеченной выше сверхнизкой концентрации, выступает в роли мощного синергиста α -токоферола, являющегося основным составляющим в системе эндогенной антирадикальной защиты клетки и принимающего важное участие в антистрессорной реакции организма.

Таблица 4

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора /мл мембран эритроцитов) в мембранах эритроцитов крови белых крыс в контроле, после однократной внутривенной инъекции 1 мл 10⁻¹²М тиосульфата натрия (1) и через 15 (2), 30 (3), 45 (4) и 60 (5) мин после введения 2.5 мкг/100 г массы тела адреналина на этом фоне

Фракции фосфолипидов	Контроль	1	2	3	4	5
Лизофосфати- дилхолины	3.9±0.34	3.6±0.3	3.7±0.4	3.7±0.4	3.8±0.5	3.7±0.3
Монофосфоино- зитиды	4.5±0.3	4.2±0.4	4.6±0.3	4.4±0.3	4.7±0.3	4.7±0.4
Свингомиелины	27.0±0.5	26.9±0.4	27.5±0.5	28.0±0.5	28.1±0.5	27.9±0.4
Фосфатидил- холины	39.0±0.8	39.7±0.7	40.1±0.8	39.9±0.7	40.1±0.8	39.6±0.7
Фосфатидил- серины	13.1±0.5	12.7±0.4	12.9±0.5	13.2±0.5	13.1±0.5	12.6±0.4
Фосфатидилэ- таноламины	8.1±0.4	7.4±0.5	7.3±0.4	7.3±0.4	7.5±0.5	7.1±0.4
СФЛ	95.6±1.8	94.5±1.8	96.1±1.8	96.8±1.8	97.3±1.9	95.6±1.9
СНФЛ	78.0±1.2	77.6±1.3	78.7±1.2	79.0±1.3	79.5±2.0	78.3±1.2
СКФЛ	17.6±0.6	16.9±0.6	16.9±0.6	17.6±0.6	17.8±0.6	17.3±0.7
К СНФЛ/СКФЛ	4.4±0.09	4.6±0.1 ^x	4.5±0.11 ^x	4.48±0.1 ^x	4.40±0.11 ^x	4.5±0.09 ^x

Примечания: n=35; обозначения те же, что и в табл. 2.

Примечательно при этом имеющее место полное нивелирование эффектов адреналина на метаболизм ФЛ уже с самого начала формирования гипергликемической реакции организма. Последнее является свидетельством соответствующего ответа организма на предварительное введение ТСН, выразившегося в формировании прочной ответной реакции организма как противодействия, направленного на нейтрализацию токсических воздействий на физиологически протекающие реакции липидного обмена. В случае же использования ТСН на фоне уже индуцированной адреналином гипергликемии характер развития эффектов нивелирования расстроенных сторон метаболизма ФЛ оказывался однотипным, но несколько затянувшимся. Однако и в данном случае, как и в предыдущем варианте эксперимента превалирование умеренно превышающих норму концентраций ЛФХ носит закономерный характер.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Հ. Կ. Բդոյան, Լ. Լ. Դանիլովա, Գ. Վ. Էլբակյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյուզյան

**Թաղանթակախյալ ֆոսֆոլիպիդների կառուցվածքամետաբոլիկ խանգարումների բնութագիրը
ադրենալինային հիպերգլիկեմիայից առաջացած օքսիդատիվ ստրեսի պայմաններում**

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ սպիտակ առնետների մոտ ադրենալինով առաջացած հիպերգլիկեմիայի պայմաններում օքսիդատիվ ստրեսը բնութագրվում է արյան էրիթրոցիտների թաղանթներում տեղի ունեցող ֆոսֆոլիպիդների որակական և քանակական վառ արտահայտված տեղաշարժերով: Վերջիններս արտահայտված են լիզոֆոսֆատիդիլխոլինների շեշտակի ավելացմամբ, որը առավել արտահայտված կատարվում է ադրենալինի ներարկումից 60 րոպե անց: Նատրիումի թիոսուլֆատի գերցածր քանակների $/10^{-4}\text{M}$, 10^{-8}M , 10^{-12}M /օգտագործման պարագայում տեղի է ունենում ֆոսֆոլիպիդային փոխանակության խախտումների վերականգնում, բացառությամբ լիզոֆոսֆատիդիլխոլինների, որոնց քանակությունը շարունակում է մնալ բարձր արժեքների սահմաններում: Նշված փաստը դիտվում է օրգանիզմի հարմարողական մեխանիզմների տեսանկյունից, որը կմեկնաբանվի հետագայում:

H. K. Bdoyan, L. L. Danilova, V. E. Elbakyan, academician K. G. Karageuzyan

**Characteristics of Structural and Methabolic Abnormalities of Membrane-bound
Phospholipids under the Conditions of Oxidative Stress, Conditioning by Adrenaline
Inducted Hyperglycemia**

The data obtained have shown that adrenaline induced hyperglycemia in white rats is accompanied by significant abnormalities in erythrocyte membranes of membrane-bound phospholipids. These changes are characterized by pronounced decrease of quantity of membranebound phosphatidylcholines, which was accompanied by the simultaneous increase of lysophosphatidylcholines level. Using on this background the super low concentrations (10^{-4}M , 10^{-8}M , 10^{-12}M) of sodium thiosulfate is characterized by normalization of disorders mentioned with the exception of lysophosphatidylcholines the high concentration of which remains unchanged. This fact has a special significance, which may be explained as the one mechanism of compensatory activity of the organism.

Литература

1. Аганянц М. А., Карагезян К. Г., Овсепян Л. М. - Информационные технологии и управление. Ереван. 2003. Т. 2. N1. С. 219-227.
2. Аганянц М. А., Мартиросян Э. А., Овсепян Л. М., Думанян Д. Г., Карабашян Л. В., Карагезян К. Г., Секоян Э. С. В сб.: Современные аспекты реабилитации в медицине. Материалы I Международной конференции. Ереван. 2003. С. 9.
3. Карагезян К. Г., Едоян А. Р., Овсепян Л. М., Едоян Л. В., Аганянц М. А., Карян Ш. С., Мартиросян Э. А. - Международная Академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник. Санкт-Петербург. 2003. Т. 86. N 4. С. 194-196.
4. Карагезян К. Г., Едоян А. Р., Едоян Л. В., Овсепян Л. М. - Доклады НАН РА. 2003. Т. 103. N 3. С. 251-256.
5. Карагезян К. Г., Едоян А. Р., Карян Ш. С., Едоян Л. В. - Доклады НАН РА. 2003. Т. 103. N 4. С. 336-341.
6. Ghazaryan A. V., Hovsepyan L. M., Karageuzyan K. G. - Iranian Journal of Biochemistry and Molecular biology. 2005. P 31.
7. Мартиросян А. А., Казарян А. В., Секоян Э. С., Карабашян Л. В., Джанполадян Е. Г., Амирханян О. М., Овакимян С. С., Овсепян Л. М., Данилова Л. Л. - Аллергология и иммунология. Афины. 2005. Т. 6. N 3. С. 368.
8. Karageuzyan K. G., Ktsoyan Zh. A., Ghazaryan A. V., Elbakyan G. V., Sarkisyan N. N., Khachatryan Z. A., Arakelova K. A., Manukyan G. P., Kazaryan K. A., Sedrakyan A. M., Hovhanessyan A. I., Tatyana M. V. - International J. on Immunorehabilitation. Athens. 2005. V. 7. N2. P. 102.
9. Казарян А. В. - Материалы Международной конференции "Ломоносов 2005". М. 2005. С. 437-439.
10. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. XXII Баховские чтения Л. Наука. 1967. 74 с.
11. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран Л. Наука. 1981. 330 с.
12. Limber G. R., Davie R. F., Haker A. M. S. - Blood. 1970. V. 36. N 2. P. 111-118.
13. Карагезян К. Г. - Лаб. дело. N 1. 1969. С. 23-26.
14. Folch J., Lees M., Sloane-Stane G. - J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.
15. Зубер В. Л. В. кн.: Методы биохим. исслед. Л. Изд-во ЛГУ. 1982. С. 74-80.