

ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ НА ВМІСТ ФОСФОЛІПІДНИХ ФРАКЦІЙ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ І ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

У роботі вивчено стан фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів лінії Вістар за умов тривалого перорального впливу поліолів – промислових хімічних забруднювачів водних об'єктів навколишнього середовища. Поліоли на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003) у дозі 1/100 LD₅₀ на 30-ту добу впливу збільшують відсотковий вміст фосфатидилетаноламіну, суттєво – лізофосфатидилхоліну на фоні зниження фосфатидилхоліну, сфінгомієліну. Підвищення вмісту лізофосфатидилхоліну є маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів. Досліджувані сполуки не впливають на відсотковий вміст фосфатидилсерину. Отримані результати свідчать про мембранотропну дію речовин, що реалізується через зміну фосфоліпідного складу клітинних мембран.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліоли, мембрани еритроцитів, мембрани гепатоцитів, фосфоліпідний склад.

ВСТУП. Порушення структурно-функціонального стану клітинних мембран, зокрема еритроцитів і гепатоцитів, за умов дії багатьох хімічних факторів супроводжується виникненням різних патофізіологічних і клінічних проявів. Структурно-функціональні властивості біологічних мембран багато в чому визначаються фосфоліпідним складом, який впливає на їх проникність, спряженість та послідовність численних ферментативних процесів. Відомо, що мембрани еритроцитів і гепатоцитів піддаються значним пошкодженням за умов дії ряду ксенобіотиків. Їх розглядають як універсальні моделі для вивчення мембранотропних ефектів [4, 5, 7].

До поширених промислових хімічних забруднювачів навколишнього середовища, в тому числі водних екосистем, належать поліоли на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60). Останні характеризуються великим об'ємом синтезу та широким використанням у промисловості й побуті як основи мийних засобів, емульгаторів, антикорозійних і бактерицидних препаратів тощо [11]. Доведено можливість надходження речовин даного класу в організм людини з питною водою. Регламентація вмісту поліолів в об'єктах навколишнього середовища здійснюється на базі використання тимчасових розрахункових нормативів. Проте механізми біологічної дії цих сполук вивчено недостатньо, а саме їх урахування є підставою для їх адекватної регламентації. Крім того, проведення таких досліджень має суттєве значен-

ня для вирішення наукової проблеми щодо охорони здоров'я населення та об'єктів довкілля від забруднення і негативного впливу шкідливих хімічних речовин, яка на сучасному етапі набула глобального світового значення та особливої актуальності для України у зв'язку з погіршенням загальної екологічної ситуації [1, 3, 10]. Роботу виконано в межах науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету "Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища" (номер держреєстрації 0110U001812).

Метою даного дослідження було визначити вміст фосфоліпідних фракцій мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів за умов тривалого впливу поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60) у дозі 1/100 LD₅₀.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: поліоксипропілентриол – П-1103К і поліоксиетилен-оксипропілентриол – П-3003-2-60. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г. Процедури з експериментальними тваринами проводили відповідно до вимог Державного комітету з етики. Щурів утримували в стаціонарних умовах віварію при постійних температурі та природному освітленні [8]. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 30 днів у дозі 1/100 LD₅₀, що, відповідно, складало: для П-1103К – 0,012 г/кг, для

© Ю. К. Резуненко, С. О. Стеценко, В. О. Прокопов, 2012.

П-3003-2-60 – 0,032 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Вміст фосфоліпідних фракцій досліджували через 30 днів після початку експерименту. В кожній групі було по 10 тварин. Забій щурів проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Плазматичні мембрани одержували методом диференційного центрифугування в градієнті щільності сахарози [9]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Кейтса [6]. Випаровування екстрактів ліпідів здійснювали у струмі сухого азоту. Для розділення індивідуальних фосфоліпідів на фракції використовували метод двомірної мікротонкошарової хроматографії [13]. Ідентифікацію фосфоліпідів проводили за допомогою специфічних реакцій та стандартних розчинів. Кількісний вміст загальних та індивідуальних фосфоліпідів у ліпідних екстрактах оцінювали за кількістю неорганічного фосфору, яку визначали за допомогою молібденового реагенту [12]. Співвідношення фосфоліпідних фракцій розраховували у відсотках фосфору фосфоліпідів кожної фракції до фосфору загальних ліпідів, взятих за 100 %. Для вивчення фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів визначали фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ), фосфатидилсерин (ФС), лізофосфатидилхолін (ЛФХ). Статистичний аналіз цифрового матеріалу проводили за допомогою комп'ютерного пакета для обробки й аналізу статистичної інформації "Statistica 6.0" [2]. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Стьюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант. Визначали середнє арифметичне варіаційного ряду (M) і середню помилку середнього арифметичного (m). Відмінності між двома вибір-

ками вважали достовірними, якщо ймовірність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Поліолі 1103К і 3003-2-60 на 30-ту добу дії в дозі 1/100 LD₅₀ призводили до таких змін фосфоліпідного складу клітинних мембран (табл.).

Спостерігалось достовірне збільшення відсотка ФЕА у мембранах еритроцитів і гепатоцитів. Для поліолу 1103К це, відповідно, складало 54 і 26 %, а для поліолу 3003-2-60 – 35 і 21 % порівняно з контрольною групою тварин. Збільшення ФЕА, найімовірніше, пов'язане зі зниженням його трансметилування та перетворенням на ФХ. Враховуючи те, що ФЕА в структурному відношенні відіграє прооксидантну роль у клітинних мембранах, то факт його підвищення свідчить про деяку компенсаторну роль з боку перебудови біологічних мембран у відповідь на тривалий вплив поліолів. Відсотковий вміст ФХ, навпаки, зазнавав достовірного зниження, яке в середньому в мембранах еритроцитів складало 28 %, а гепатоцитів – 40 %. Слід зазначити, що на цьому фоні суттєво збільшувався вміст ЛФХ: для поліолу 1103К – у 2,7 і 6,4 раза, для 3003-2-60 – у 2,4 і 3,6 раза відповідно для еритроцитів і гепатоцитів. Зменшення рівня ФХ свідчить, з одного боку, про зниження його ресинтезу в процесі обміну фосфоліпідів, а з іншого – про зниження його антиоксидантної функції та перехід з ненасиченого стану в насичений. Тоді підвищення фракції ЛФХ відбувається внаслідок блокади метаболічних шляхів перетворення на ФХ, порушення процесів інгібування та виведення з організму.

Підвищення концентрації ЛФХ може бути маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів. Цю фракцію також можна роз-

Таблиця – Вплив поліолів у дозі 1/100 LD₅₀ на вміст фосфоліпідних фракцій мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів (% від загальної кількості фосфоліпідів, M±m, n=10)

Поліол	ФЕА	ФХ	СМ	ФС	ЛФХ
Еритроцити					
1103К	32,5±2,7*	36,3±3,2*	8,5±0,8*	12,6±0,9	12,5±0,8*
3003-2-60	28,4±2,5*	31,9±2,7*	9,3±0,8*	11,9±1,2	11,3±0,9*
Контроль	21,1±1,9	47,2±5,3	14,2±1,1	13,4±1,0	4,7±0,5
Гепатоцити					
1103К	29,7±3,2*	26,7±2,2*	9,4±0,9*	12,3±1,1	8,6±0,5*
3003-2-60	28,5±2,3*	23,1±1,9*	8,8±0,7*	14,9±1,3*	7,9±0,7*
Контроль	23,5±2,1	41,3±3,8	18,5±1,1	11,3±1,2	2,2±0,2

Примітки:

1. Вміст загальних фосфоліпідів еритроцитів у контрольній групі тварин становив (2,7±0,3) ммоль/г білка, в дослідних групах – у середньому (2,9±0,3) ммоль/г білка; вміст загальних фосфоліпідів гепатоцитів у контрольній групі тварин складав (0,74±0,05) ммоль/г білка, в дослідних групах – у середньому (0,71±0,06) ммоль/г білка.

2. * – $p < 0,05$ відносно контролю.

глядати як індикатор розгортання процесів вільнорадикального окиснення, що зумовлює порушення проникності в бік її збільшення, зміну плинності й стабільності біологічних мембран. Лізоформи фосфоліпідів, як відомо, сприяють появі дефектів у ліпідному бішарі та виникненню в ньому іонних каналів, що супроводжується порушенням бар'єрної функції мембрани.

За дії поліолів у дозі 1/100 LD₅₀ спостерігалось, порівняно з контрольною групою тварин, достовірне зниження вмісту СМ фракції: у мембранах еритроцитів – на 40 і 35 %, гепатоцитів – на 49 і 52 % відповідно для поліолів 1103К та 3003-2-60. Зменшення СМ може бути однією з причин зниження захисних властивостей клітинних мембран, виникнення ацидотичних зсувів у плазмі крові, змін електростатичних властивостей та проникності мембран.

Виявлені зміни вмісту фосфоліпідних фракцій ФЕА, ФХ, СМ, ЛФХ відбувалися на фоні незмінного вмісту ФС.

Підтвердженням порушення структурної організації ліпідного матриксу клітинних мембран еритроцитів і гепатоцитів є підвищення коефіцієнта співвідношення суми легкоокиснювальних фракцій фосфоліпідів (ФС, ФЕА) до суми важкоокиснювальних фракцій (СМ, ФХ). Для еритроцитів у випадку поліолу 1103К цей коефіцієнт дорівнював (1,08±0,12) ум. од., у випадку 3003-2-60 – (0,98±0,095) ум. од. на фоні контролю (0,61±0,064) ум. од. Для гепатоцитів це складало, відповідно, (1,72±0,18) і (1,39±0,12) ум. од. на фоні контролю (0,57±0,06) ум. од.

Таким чином, тривалий вплив поліолів призводить до суттєвих змін фосфоліпідного складу мембран еритроцитів і гепатоцитів. Наслідками цього впливу є збільшення їх проникності, порушення трансмембранної дифузії, полегшення надходження медіаторів запалення в тканини, збільшення масопереносу кисню, від вмісту якого прямо залежить інтенсивність вільнорадикальних процесів. Але

безпосередньо на фосфоліпідному складі, як основному субстраті окиснювальних процесів у біомембранах, відображається виявлена в ході попередніх досліджень активація перекисного окиснення ліпідів, вільнорадикальної модифікації білків, NO-залежної окиснювальної системи за умов впливу поліолів. Про глибину інтенсифікації вільнорадикальних реакцій свідчить також зниження важкоокиснювальної фосфоліпідної фракції – СМ, яка в метаболічному відношенні відрізняється від інших фракцій найменшою швидкістю обміну в мембранах.

ВИСНОВКИ. 1. На 30-ту добу дія поліолів на основі гліцеролу в дозі 1/100 LD₅₀ супроводжується збільшенням відсоткового вмісту ФЕА та, особливо, ЛФХ на фоні зниження ФХ і СМ у мембранах еритроцитів і гепатоцитів щурів. Підвищення вмісту ЛФХ є маркером розгортання патологічних змін на рівні мембранних структур за умов тривалого впливу поліолів.

2. Досліджувані сполуки не впливають на відсотковий вміст ФС у мембранах еритроцитів і гепатоцитів щурів.

3. На 30-ту добу поліолу 1103К і 3003-2-60 у дозі 1/100 LD₅₀ підвищують коефіцієнт співвідношення суми легкоокиснювальних фракцій фосфоліпідів (ФС, ФЕА) до суми важкоокиснювальних фракцій (СМ, ФХ), що також вказує на порушення структурної організації ліпідного матриксу клітинних мембран еритроцитів і гепатоцитів щурів.

4. Виявлені зміни фосфоліпідного складу біомембран з суттєвим утворенням лізоформ фосфоліпідів свідчать про мембранотропні ефекти поліолів на основі гліцеролу.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування механізмів біологічної дії поліолів, зокрема оцінку активності ферментних і рецепторних мембранозв'язаних комплексів, з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белозерова С. М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С. М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 3. – С. 13–19.
2. Боровиков В. А. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В. А. Боровиков. – СПб. : Питер, 2003. – 688 с.
3. Гнатейко О. З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зов-

нішнього середовища / О. З. Гнатейко, Н. С. Лук'яненко // Здоровье ребенка. – 2007. – № 6 (9). – С. 15–24.

4. Губський Ю. І. Жирнокислотний склад ліпідів головного мозку щурів при токсичному ураженні 1,2-дихлоретаном та уведення нікотинаміду / Ю. І. Губський, Л. В. Яницька, Т. С. Брюзгіна // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – № 1. – С. 19–22.

5. Камкин А. Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. – М. : Академия Год, 2008. – 592 с.

6. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.
7. Литовченко Т. А. Исследование фосфолипидного состава мембран эритроцитов у больных эпилепсией / Т. А. Литовченко, В. И. Жуков // Проблемы медицины. – 1999. – № 5. – С. 49–50.
8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
9. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М. : Медицина, 1977. – 371 с.
10. Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону : міжвідомч. зб. наук. праць / відп. ред. С. В. Беспалова. – Донецьк : ДонНУ, 2006. – С. 106–112.
11. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, Л. Д. Попова, О. В. Зайцева [и др.]. – Х. : Торнадо, 2000. – 438 с.
12. Brockhuse R. M. Phospholipids structure of erythrocytes and hepatocytes / R. M. Brockhuse // Clin. Biochem. – 1974. – **14**, № 3. – P. 157–158.
13. Vashovsky V. E. UPTL of phospholipids micstures containing phosphotidyl glycerol / V. E. Vashovsky, T. A. Terekkive // J. High Res. Chromatogr. – 1979. – **2**, № 11. – P.671–672.

Ю. К. Резуненко, С. А. Стеценко, В. А. Прокопов
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ВЛИЯНИЕ ПОЛИОЛОВ НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ ФРАКЦИЙ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Резюме

В работе изучено состояние фосфолипидного состава мембран эритроцитов и гепатоцитов крыс линии Вистар в условиях длительного перорального воздействия полиолов – промышленных химических загрязнителей водных объектов окружающей среды. Полиолы на основе глицерола (П-1103К, П-3003) в дозе 1/100 LD₅₀ на 30-е сутки влияния увеличивают процентное содержание фосфатидилэтаноламина, существенно – лизофосфатидилхолина на фоне снижения фосфатидилхолина, сфингомиелина. Повышение содержания лизофосфатидилхолина является маркером развертывания патологических изменений на уровне мембранных структур в условиях длительного воздействия полиолов. Исследуемые вещества не влияют на процентное содержание фосфатидилсерина. Полученные результаты свидетельствуют о мембранотропном действии веществ, которое реализуется через изменение фосфолипидного состава клеточных мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полиолы, мембраны эритроцитов, мембраны гепатоцитов, фосфолипидный состав.

Yu. K. Rezunenکو, S. O. Stetsenko, V. O. Prokopov
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF POLYOLS STRUCTURALLY BASED ON GLYCEROL ON CONTENT OF PHOSPHOLIPID FRACTIONS IN ERYTHROCYTE AND HEPATOCYTE MEMBRANES OF RATS

Summary

The present work investigates the state of phospholipid membranes of erythrocytes and hepatocytes in the rat organism (Wistar population) at the conditions of polyols prolonged peroral administration. These substances are primary industrial chemical pollutants of water objects environment. Polyols chemically based on glycerol (P-1103K, P-3003) in 1/100 LD₅₀ on the 30th experimental day increase the content of phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine on the background of decreasing the content of phosphatidylcholine, sphingomyelin. Increasing of the content of lysophosphatidylcholine is a marker of the beginning pathological processes at the level of membrane structures at the conditions of polyols prolonged administration. These compounds don't influence on the content of phosphatidylserine. The obtained results support membranotropic action of polyols which is realized by changing the phospholipid content of cells' membranes.

KEY WORDS: polyols, erythrocyte membranes, hepatocyte membranes, phospholipid content.

Отримано 12.11.11

Адреса для листування: Ю. К. Резуненко, Харківський національний медичний університет, просп. Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.