

ЗМІНИ ФОСФОЛІПІДНОГО СКЛАДУ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ У ЩУРІВ

**Є. В. Нікітін, К. Л. Сервецький, Т. В. Чабан,
С. М. Солтик**

Одеський державний медичний університет

Вступ

Широке використання хімічних речовин у промисловості і сільському господарстві призвело до погіршення екологічної ситуації в Україні останніми роками. Такі сполуки накопичуються у навколишньому середовищі, надходять до організму людини з повітрям, водою, їжею в підвищених концентраціях та негативно впливають на стан здоров'я населення. Більшість цих реагентів здатні уражати печінку, викликати специфічні дозозалежні функціональні та морфологічні зміни [2, 5, 6, 10, 11].

Спектр таких хімічних речовин дуже великий, вони відрізняються за своєю структурою та різноманітністю печінкових уражень. Відомо, що прямі гепатотоксичні речовини (чотирьоххлористий вуглець, трихлоретилен, тетрахлоретилен, хлоровані нафтени та ін.) здатні викликати гепатоцелюлярні ураження, включаючи плазматичну мембрану, ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії, лізосоми і ядро. Неминучим для будь-якого ураження гепатоциту є підвищення рівня перекисного окислення ліпідів. Стійкість біологічних мембран до розвитку в них процесу вільнорадикального окислення пов'язується з одного боку із наявністю тісного контакту між заглибленими у мембрану білковими глобулами та їх найближчим ліпідним оточенням, а з іншого - ламелярною організацією фосфоліпідів (ФЛ) у тих частинах мембран, які не містять білок. Відомо, що ФЛ складають 90 % всіх ліпідів мітохондрій, беруть участь у проведенні нервового імпульсу, транспорті іонів через клітинні і субклітинні мембрани, транспорті електронів. При

вилученні ФЛ із мітохондрій має місце повна втрата їх ферментативної активності. Продукти ФЛ здатні істотно впливати на перебіг захворювання, обумовлювати ефективність призначеного лікування [1, 3, 4, 8, 9].

Сприймаючи до уваги важливе значення ФЛ у механізмах формування клітинних мембран, на наш погляд, є доцільним провести дослідження цих показників, визначити залежність між ними при токсичних ураженнях печінки, що дозволить більш глибоко розкрити патогенетичні механізми формування змін, які відбуваються в гепатоцитах та знайти нові підходи до корекції патологічного процесу.

В якості моделі змін, що відбуваються в печінці при різних захворюваннях можна використовувати токсичне ураження, спричинене чотирьоххлористим вуглецем (CCl_4). Такий вибір обумовлюється тим, що морфологічні та біохімічні порушення, які відбуваються в печінці під впливом CCl_4 не є специфічними, а спостерігаються при різних захворюваннях [7, 11]. Подальше вивчення змін, що мають місце у гепатоцитах дозволить висвітлити невідомі раніше ланки патогенезу гепатиту, викликаного CCl_4 , з'ясувати, яким чином ці зміни в печінкових клітинах відображаються на показниках периферичної крові, екстраполювати отримані дані на аналогічні при гострих гепатитах іншої, зокрема, вірусної етіології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: робота виконувалася відповідно до основного плану науково-дослідних робіт (НДР) Одеського державного медичного університету і є фрагментом теми НДР: "Взаємозв'язок патологічних і імунологічних змін при гепатитах різної етіології, TORCH-інфекціях та їх корекція" (№ держреєстрації 0108U001104).

Метою дослідження було вивчення вмісту загальних ФЛ та визначення фосфоліпідного складу в мембранах у мембранах еритроцитів при токсичному гепатиті, обумовленому CCl_4 .

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проведені на 80 статевозрі-

лих щурах - самцях масою 180 - 200 грамів. Усі тварини утримувались за стандартних умов віварію. У відповідності до поставленої мети всі щури було розділено на дві групи. Першу (контрольну) групу склали 40 інтактних тварин. Другу групу - 40 тварин, яким внутрішньошлунково одноразово вводили CCl_4 дозою 5 мг/кг маси тварини у вигляді 50 % масляного розчину, що відтворювало гострий гепатит. Після введення чотирихлористого вуглеця проводили дослідження фосфоліпідного складу в мембранах еритроцитів досліджуваних тварин через 24, 48, 72 і 168 годин. Для виділення фракції ФЛ використовували загальну ліпідну фракцію, вилучену із тканин за методом Фолча. Виділення фракції фосфоліпідів здійснювали за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Розподілу ФЛ на окремі фракції проводили на скляних пластинках розміром 20x20 см із застосуванням 2 систем розчинників: хлороформ-метанол-7 н. NH_3 (60 : 35 : 5) і хлороформ-метанол-оцтова кислота-вода (80 : 60 : 7,4 : 1,2). Такий метод дозволяв розділити ФЛ на наступні фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), сфінгомієлін (СФМ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноланін (ФЕА), фосфатидилсерин (ФС) та інші. Величини R_f окремих фракцій ФЛ склали: ЛФХ - 0,17, СФМ - 0,28, ФХ - 0,43, ФЕА - 0,53, ФС - 0,10. Кількість ФЛ оцінювали за реакцією взаємодії неорганічного фосфату з молібдатом амонію. Для визначення кількості загального холестерину (ХС) використовували уніфікований метод по реакції з хлорним залізом після екстракції ізопропанолом. Також розраховували молярне співвідношення загального ХС і загальних ФЛ, яке виражали коефіцієнтом ХС/ФЛ.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері Intel Celeron 2300 за допомогою програм Microsoft Office 2000, Statistica for Windows. Бази даних формували в таблицях Microsoft Excel.

Отримані результати та їх обговорення

Важливішими компонентами клітинних мембран є ФЛ, що містять у своєму складі незамінні вищі жирні кислоти, які не синтезуються в організмі. За допомогою ФЛ не лише підтри-

мується стабільність мембран, а й забезпечуються процеси біотрансформації гуморальних сигналів. Порушення морфофункціонального стану мембран є одним з основних наслідків патологічного процесу.

У результаті проведеного дослідження встановлено зменшення вмісту загальних ФЛ у мембранах еритроцитів щурів з гепатитом, викликаним CCl_4 (табл.).

Таблиця

Динаміка вмісту загальних ФЛ, ХС і окремих фракцій ФЛ у мембранах еритроцитів при токсичному гепатиті, обумовленому CCl_4 залежно від тривалості хвороби ($M \pm m$)

Показники	Токсичний гепатит (n=40)				Контрольна група (n=40)
	24 години	48 годин	72 години	168 годин	
Загальні ФЛ, ммоль/л	2,39 ± 0,15*	1,79 ± 0,17*	1,37 ± 0,06*	1,96 ± 0,08*	2,87 ± 0,11
Загальні ФЛ, мг/100 мл еритроцитів	197,06 ± 5,71*	180,88 ± 6,48*	140,09 ± 5,23*	188,36 ± 7,28*	242,08 ± 7,83
ЛФХ, мг/100 мл еритроцитів	27,38 ± 1,23*	32,54 ± 1,97*	38,12 ± 2,65*	29,35 ± 1,42*	23,71 ± 1,09
СФМ, мг/100 мл еритроцитів	41,43 ± 1,24	49,47 ± 1,37*	52,55 ± 1,36*	46,83 ± 1,76*	42,79 ± 1,63
ФХ, мг/100 мл еритроцитів	74,44 ± 3,69*	53,21 ± 26,58*	26,58 ± 1,24*	56,54 ± 2,35*	98,15 ± 8,56
ФЕА, мг/100 мл еритроцитів	35,73 ± 1,68*	29,63 ± 1,04*	14,32 ± 1,08*	31,01 ± 1,06*	52,84 ± 2,27
ФС, мг/100 мл еритроцитів	8,30 ± 0,53*	10,02 ± 0,76	5,32 ± 0,43*	11,68 ± 0,39*	9,63 ± 0,41
ФФК, мг/100 мл еритроцитів	9,78 ± 1,06*	6,01 ± 0,44*	3,20 ± 0,62*	12,95 ± 1,57	14,96 ± 1,58
Загальний ХС, ммоль/л	3,51 ± 0,13*	4,61 ± 0,18*	4,78 ± 0,17*	3,61 ± 0,14*	2,43 ± 0,12
ХС/ФЛ	1,47 ± 0,02*	2,58 ± 0,17*	3,49 ± 0,18*	1,84 ± 0,15*	0,85 ± 0,03

Примітка: * - вірогідна різниця порівняно з контрольною групою (p<0,05).

Так, вже через 24 години після введення чотирьоххлористого вуглеця кількість загальних ФЛ підвищувалася в 1,2 разу порівняно з показником контрольної групи ($p < 0,05$). Найменше значення вмісту загальних ФЛ, яке дорівнювало ($1,37 \pm 0,06$) ммоль/л, відмічено через 72 години від початку експерименту (в 2,1 разу нижче за результат групи контролю, $p < 0,05$). Через 168 годин кількість загальних ФЛ збільшилася і досягала ($1,96 \pm 0,08$) ммоль/л, що було лише в 1,5 разу менше за контроль ($p < 0,05$) і в 1,4 разу вище за результат, встановлений на 3 добу.

При гепатиті, спричиненому CCl_4 також відзначали зміни у співвідношенні ФЛ в еритроцитах щурів (див. табл.). На 3 добу експерименту встановлені найвищі показники вмісту ЛФХ і СФМ, які відповідно в 1,6 і 1,2 разу перевищували результат контрольної групи ($p < 0,05$). Кількість інших фракцій ФЛ у цей період набувала значного зменшення (див. табл.). Однак, кратність зниження вмісту ФХ, ФЕА, ФС і ФФК була різною: кількість ФХ і ФЕА знижалася в 3,7 разу, ФС - в 1,8 разу, а ФФК - в 4,7 разу. На наш погляд, збільшення кількості важкоокислювальних фракцій ФЛ - ЛФХ і СФМ може свідчити про тяжкість перебігу патологічного процесу при CCl_4 -обумовленому гепатиті у щурів.

ФХ являється універсальним будівельним блоком для клітинних мембран, в тому числі й мембран гепатоцитів. Сучасними теоретичними і клінічними дослідженнями встановлено, що ФХ захищає печінку від ушкоджуючої дії цілого ряду токсичних речовин - алкоголю, деяких фармацевтичних препаратів, технічних забруднень, дії вірусів та отрут, які здатні руйнувати клітинні мембрани. Тому зниження вмісту ФХ, поряд із зменшенням кількості інших легкоокислювальних фракцій ФЛ, на наш погляд, може свідчити на користь недостатності компенсаторних механізмів підтримки морфофункціонального гомеостазу клітинних мембран, підвищення їхньої проникності або деградації ліпідного біошару.

Привертає увагу той факт, що у щурів, яким вводили чотирьох хлористим вуглецем відбувалися не лише зміни вмісту

окремих фракцій ФЛ в еритроцитах, але й також їхній відсотковий перерозподіл (див. табл.). Якщо в контрольній групі тварин частка ФХ була найбільшою і складала 40,5 %, то на третю добу експерименту вона складала лише 19,0 %. Одночасно встановлено значне збільшення складової ЛФХ до 27,2 % (проти 9,8 % у інтактних тварин) і СФМ - 37,5 % (проти 17,7 % у інтактних тварин). Поряд з цим вдвічі зменшувався відносний вміст ФЕА (10,2 %) і в 2,7 разу - ФФК (2,3 %). У контрольній групі середня кількість ФЕА складала 21,8 %, а ФФК - 6,2 % від загального вмісту ФЛ.

До сьомої доби експерименту відбувалося поступове відновлення кількості окремих фракцій загальних ФЛ в еритроцитах щурів з токсичним гепатитом.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що гепатит, спричинений CCl_4 у щурів також супроводжувався зміною кількості загального ХС (див. табл.). На першу добу кількість загального ХС в мембранах еритроцитів тварин збільшувалася в 1,4 разу, на другу - в 1,8 разу, на третю - майже вдвічі. На сьому добу вміст загального ХС у експериментальних тварин знижався, але був в 1,5 разу більше, ніж у контрольної групи ($p < 0,05$).

Порушення вмісту загальних ФЛ і ХС протягом проведення експерименту суттєво відбивалися на коефіцієнті співвідношення ХС/ФЛ. Як видно з таблиці, максимальне значення цього коефіцієнту ($3,49 \pm 0,18$) відзначено через 72 години після затравки тварин, коли відмічали найбільшу кількість загального ХС і найменший вміст загальних ФЛ, а також виражені зміни у складі окремих фракцій ФЛ. Через 168 годин показник співвідношення ХС/ФЛ складав ($1,84 \pm 0,15$), що в 2,2 разу перевищувало результат, встановлений в контрольній групі тварин ($p < 0,05$).

Таким чином, в результаті токсичного гепатиту, викликаного CCl_4 , відбуваються значні зміни кількості загальних ФЛ, порушується динамічна система вмісту окремих фракцій ФЛ, що призводить до морфофункціональних розладів у мембранах еритроцитів та подальшого прогресування патологічного процесу.

Висновки

1. В еритроцитах щурів з CCl_4 - токсичним гепатитом встановлено зменшення кількості загальних ФЛ та перерозподіл відносної кількості окремих фракцій ФЛ з переважанням важкоокислювальних фракцій - ЛФХ і СФМ.

2. Підвищення вмісту загального ХС з одночасним зменшенням кількості загальних ФЛ призводить до підвищення коефіцієнту ХС/ФЛ, а разом із змінами вмісту фракцій пула ФЛ - морфофункціональних порушень у мембранах еритроцитів.

3. Отримані дані дозволяють зробити припущення, що виявлені негативні зміни відбуваються не лише в мембранах еритроцитів, але й гепатоцитів, що потребує подальшого вивчення.

Література

1. Биологические мембраны / под ред. Дж. Б. С. Финдлея, В. Х. Эванза ; пер. с англ. - М. : Медицина, 1990. - 232 с.
2. Дегтярева И. И. Клиническая гастроэнтерология / И. И. Дегтярева. - М.: МИА, 2004. - 616 с.
3. Ивашкин В. Т. Диффузные заболевания печени : диагностика и лечение / В. Т. Ивашкин. - М.: М-Вести, 2004. - 71 с.
4. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева, Е. А. Степовая [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - № 2. - С. 62-67.
5. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення / І. М. Трахтенберг, Н. М. Дитруха, О. С. Моложава, Ю. М. Миронюк // Інфекційні хвороби. - 2008. - № 4. - С. 82-89.
6. Радченко В. Г. Основы клинической гепатологии : заболевания печени и билиарной системы / В. Г. Радченко. - М.: Бином, 2005. - 862 с.
7. Скакун Н. П. Поражение печени четыреххлористым углеродом / Н.П. Скакун, Г.Т. Писько, И.П. Мосейчук. - М.: НИИТЭХИМ, 1989. - 107 с.
8. Фосфолипидный состав эритроцитов при неврологических нарушениях у детей; влияние сопутствующей па-

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

тологии / Е. М. Васильев, М. И. Бакаков, Г. Ф. Гордеев [и др.] // Медицинский научный и учебно-методический журнал. - 2001. - № 2. - С. 92-109.

9. Kaplowitz N. Mechanism of liver cell injury / N. Kaplowitz // J. Hepatol. - 2000. - Vol. 32, Suppl. 1. - P. 39-47.

10. Long R. Specialist Training in Gastroenterology and Liver Disease / R. Long. - Elsevier Science, 2005. - 304 p.

11. Mechanism of Hepatotoxicity / H. Jaeschke, G. S. Gores, A. I. Cederbaum [e.a.] // Toxicological sciences. - 2002. - Vol. 65, № 2. - P. 166-176.

Резюме

Нікітін Є. В., Сервецький К. Л., Чабан Т. В., Солтик С. М. Зміни фосфоліпідного складу мембран еритроцитів при токсичному гепатиті у щурів.

Обстежено 40 щурів з токсичним гепатитом, спричиненим CCl_4 і 40 інтактних тварин. У мембранах еритроцитів експериментальних тварин встановлено зниження кількості загальних фосфоліпідів, перерозподіл відносної кількості окремих фракцій фосфоліпідів, а також збільшення вмісту загального холестерину.

Ключові слова: токсичний гепатит, фосфоліпіди мембран еритроцитів, щури.

Резюме

Никитин Е. В., Серветский К. Л., Чабан Т. В., Солтык С. М. Изменения фосфолипидного состава мембран эритроцитов при токсическом гепатите у крыс.

Обследовано 40 крыс с токсическим гепатитом, вызванным CCl_4 и 40 интактных животных. В мембранах эритроцитов экспериментальных животных установлено снижение количества общих фосфолипидов, перераспределение относительного количества отдельных фракций фосфолипидов, также увеличение содержания общего холестерина.

Ключевые слова: токсический гепатит, фосфолипиды мембран эритроцитов, крысы.

Summary

Nikitin E. V., Servetsky K. L., Chaban T. V., Soltuk S. M. Changes of phospholipid state of erythrocytes' membranes in toxic hepatitis in rats.

40 rats with toxic hepatitis, which caused by CCl_4 and 40 intact animals, were observed. Lower level of general phospholipids, changes of specific parts of phospholipid fractions and higher level of general cholesterol are found in erythrocytes' membranes of experimental animals.

Key words: toxic hepatitis, phospholipid of erythrocytes' membranes, rats.

Рецензент д.біол.н., проф. С.М.Смірнов

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики