

Л. М. Овсепян, А. В. Зангинян, Г. С. Казарян

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ЭХИНОКОККОЗЕ ПЕЧЕНИ

Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Армении, Республика Армения, 0014, Ереван, ул. Асратяна, 7

Проведено исследование по изучению содержания фосфолипидов и процесса перекисного окисления фосфолипидов в мембранах эритроцитов больных эхинококком печени пациентов до операции и после операции на 3-10 день. Обнаружено изменение качественного и количественного содержания фосфолипидов и активирование свободнорадикальных процессов у больных эхинококкозом печени до операции. После операции к 10 дню наблюдается тенденция к нормализации изученных процессов.

Ключевые слова: эхинококкоз печени, фосфолипиды, малоновый диальдегид

L.M. Hovsepyan, A.V. Zanginyan, G.S. Kazaryan

STUDY ON THE PHOSPHOLIPID CONTENT AND LIPID PEROXIDATION IN ERYTHROCYTE MEMBRANES OF PATIENTS WITH LIVER ECHINOCOCCOSUS

The Institute of Molecular Biology (IMB) of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia 7, Hasratyan St., 0014, Yerevan

A study on the phospholipid content and the process of peroxidation of phospholipids in erythrocyte membranes of patients with liver echinococcosis before surgery and after surgery for 3–10 days. Found to change in the qualitative and quantitative content of phospholipids and activation of free radical processes in patients with hepatic echinococcosis before operation. After surgery, the 10 day trend towards normalization of the studied processes.

Keywords: hydatidcyst of the liver, phospholipids, malondialdehyde

Эхинококкоз печени (ЭП) является одним из наиболее распространенных и тяжелых паразитарных заболеваний, лечение которого остается весьма актуальной проблемой. ЭП вызывает глубокие функциональные изменения в печени, приводящие к местным и общим осложнениям [1, 8]. Вследствие сдавливания эхинококковыми цистами ткани печени происходит ишемия ткани печени, приводящая к нарушению обменных процессов в ней. Многочисленными исследованиями установлено, что ишемия оказывает многогранный эффект на внутриклеточные процессы: способствует развитию дефицита энергии, окислительного стресса, активизирует механизмы повреждения мембранных структур клетки [2].

Одним из главных структурных элементов мембран являются фосфолипиды, участвующие почти во всех процессах, обуславливающих и поддерживающих нормальный уровень клеточной активности. Процессы гидролиза, ресинтеза и окисления фосфолипидов обеспечивают динамическое равновесие обменных процессов в клеточных мембранах, нарушение которых лежат в основе развития патологических процессов [13].

В настоящее время установлено, что мембрана эритроцитов по своей структуре и функциям идентична мембранам клеток организма в целом и что ей присущи общие принципы молекулярной организации плазматических мембран. Публикации некоторых исследователей позволяют утверждать,

что эритроциты не только вовлекаются в патологический процесс при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза [5, 7].

Целью исследования явилось исследование содержания фосфолипидов и процесса перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов больных эхинококкозом.

Материалы и методы

Исследование проводили на больных эхинококкозом печени людей, поступивших в стационар. Всем пациентам в период предоперационного обследования с целью уточнения диагноза, размеров, локализации очаговых образований выполнялись КТ и УЗИ брюшной полости. Пробы крови брались за 1 день до операции и после операции на 3, 5, 10-й день. Контролем были доноры.

Мембраны эритроцитов выделяли центрифугированием с использованием буфера (смесь бикарбоната натрия, этилендиаминтетраацетата и хлористого натрия) [11].

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча. Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля ("Мерк", Германия) в системе растворителей хлороформ:метанол:аммиак в соотношении (65:35:5). Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом количества неорганического фосфора в 1 мкг сухой ткани [4].

Об активности перекисного окисления липидов судили по количеству образования малонового ди-

Для корреспонденции: Овсепян Лаура Михайловна, канд. биол. наук, зав. лаб. молекулярной микробиологии, e-mail: lhovser@mail.ru

альдегида (МДА), который определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [6]. Количество белка определяли по Лоури [12].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования (см. таблицу) фосфолипидный спектр мембран эритроцитов доноров состоит из 7 фракций — фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС), лизофосфатидилхолины (ЛФХ), фосфоинозитиды (ФИ), сфингомиелины (СФМ), кардиолипины (КЛ).

Особого внимания заслуживают обнаруженное нами уменьшение содержания ФХ, при параллельном увеличении количества ЛФХ в мембранах эритроцитов пациентов больных ЭП до операции.

ФХ является основным фосфолипидом мембран клеток (содержание его в мембранах различных клеток составляет 25—40% суммы фосфолипидов). Помимо основной структурообразующей функции ФХ служит источником целого ряда липидных мессенджеров и биоактивных соединений, таких как лизо-ФХ, дилицеридов, фактора активации тромбоцитов [10]. Уменьшение ФХ в мембранах эритроцитов приводит к нарушению структурной целостности мембраны и связанных с этим функций нормального метаболизма.

Исследование ЛФХ позволило обнаружить увеличение его содержания в мембранах эритроцитах людей с ЭП, в особенности до операции и в первые дни после операции. Высокие концентрации ЛФХ нарушают целостность мембраны воздействуют на активности многих мембранных ферментов и могут даже приводить к лизису клеток. ЛФХ образуется при гидролизе ФХ фосфолипазой A_2 . Вследствие сдавливания эхинококковыми цистами ткани печени происходит ишемия ткани печени, приводящая к недостаточности работы дыхательной цепи и уменьшению образования АТФ, что приводит к нарушению активности Na , K -АТФаз, в результате чего в клетках накапливаются ионы Ca , которые являются активаторами фосфолипазы A_2 .

Исследование ФС и ФЭ также обнаружило уменьшение их содержания в эритроцитарной мембране.

В состав указанных фосфолипидов входят в основном ненасыщенные жирные кислоты, которые легко подвергаются окислению под действием свободных радикалов.

Заслуживает внимания увеличение содержания ФИ, которые являются предшественниками вторичных мессенджеров, таких как инозинтрифосфат-1,4,5 и дилицерид в процессах трансдукции сигнала. Присутствуя в мембране в минорных количествах, они обладают активным метаболизмом, строго контролирующим и реагирующим на внеклеточные воздействия, поэтому дисфункции в контроле их уровня часто ведут к патологиям.

Большую роль в индукции апоптоза в митохондриях играют КЛ, содержание которых заметно уменьшается в мембранах эритроцитов при эхинококкозе, что связано с окислительной модификацией этих липидов.

Исследование СФМ позволило обнаружить увеличение их содержания при развитии эхинококкоза. В молекуле СФМ присутствуют в основном остатки насыщенных жирных кислот. Вследствие этого он наряду с холестерином способствует повышению микровязкости липидного бислоя мембраны, его ригидности, что сказывается на работе мембранозависимых ферментов.

Результаты исследования выявили, что отмеченные изменения в содержании фосфолипидов пациентов с ЭП имеют место до операции и на 3-й день после операции.

К 10-му дню обнаруживалась тенденция к нормализации показателей содержания фосфолипидов к показателям доноров.

Многочисленными исследованиями установлено, что изменение состава липидов в мембране клеток наряду с метаболическими изменениями чаще всего вызвано процессами свободнорадикального окисления [3, 9]. Исходя из этого, нами проведено исследование по определению содержания свободнорадикальных процессов в мембранах эритроцитов больных эхинококкозом. Образование перекисей липидов регулируется каталитическими системами. Аскорбатзависимая система перекисного окисления использует в качестве восстановителя аскорбиновую кислоту. Другая, НАДФН-зависимая ферментная система является характерной для митохондрий и эн-

Содержание фосфолипидов (% от общего количества фосфолипидов) в мембранах эритроцитов больных эхинококкозом печени ($n = 10$)

Показатель	Контрольная группа (доноры)	Больные ЭП			
		до операции	3-й день после операции	5-й день после операции	10-й день после операции
ЛФХ	10,0 ± 0,5	16,7 ± 0,8*	15,3 ± 1,0**	13,3 ± 1,1**	12,2 ± 0,4
СФМ	18,8 ± 1,5	25,8 ± 1,8**	24,1 ± 1,7***	24,3 ± 1,1***	22,5 ± 2,1
ФИ	8,6 ± 1,2	16,6 ± 1,5*	15,8 ± 1,8**	14,7 ± 1,3**	10,8 ± 0,7
ФХ	28,3 ± 1,8	18,8 ± 1,6***	20,1 ± 1,7***	20,3 ± 1,8***	22,7 ± 2,0
ФС	14,3 ± 1,4	9,6 ± 1,1**	10,8 ± 1,2	12,2 ± 1,1	13,5 ± 1,3
ФЭ	8,5 ± 0,7	6,0 ± 0,8**	7,7 ± 0,6	7,8 ± 0,8	8,4 ± 0,7
КЛ	11,5 ± 0,5	7,1 ± 0,6*	7,3 ± 0,7 *	7,4 ± 0,8*	9,3 ± 0,8

Примечание: Достоверность отличий по сравнению с контрольной группой: * — $p < 0,001$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,05$.

доплазматического ретикула и использует в качестве донора электронов восстановленный НАДФН.

Исследование содержания продуктов перекисного окисления липидов у больных эхинококкозом показало их увеличение (см. рисунок). Существенно выше были показатели МДА за день до операции, что составило в аскорбатзависимой системе окисления 8,6 нмоль на 1 мг белка, а в НАДФН-зависимой составило 6,3 нмоль на 1 мг белка, что почти в 2,5 раза превышает их содержание в контрольной группе. На 3-й день после операции наблюдался также повышенный уровень МДА, который снизился на 10-й день после операции. МДА является продуктом окислительного распада полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой) – важнейших компонентов фосфолипидов биологических мембран. При окислении ненасыщенных жирнокислотных цепей фосфолипидов в области сопряженных двойных связей образуются поры, которые нарушают целостность мембраны, следствием чего является нарушение нормального функционирования обменных процессов. При избыточной генерации АФК процесс принимает каскадный характер, что приводит к липидным и белковым нарушениям в структуре клеточных мембран, изменению вязкости липидного бислоя, конформации мембранных белков, что отражается на функционировании ионных каналов и работе ферментов, приводящих к повреждению гепатоцитов.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что ЭП сопровождается изменением содержания различных категорий липидов и активированием свободнорадикальных процессов в мембранах эритроцитов до операции и на 3-й день после операции. К 10-му дню после операции наблюдается частичная нормализации изученных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акбаев М.Ш. Паразитология и инвазионные болезни животных. — М., 2002.
2. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. — М., 1989.
3. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001.
4. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. Л., 1982.
5. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Вечерский Ю.Ю. и др. // Патоморфоз эритроцита у больных с приобретенными пороками сердца и в условиях их хирургической коррекции // Бюл. экспер. биол. — 2004. — Т. 137, № 3. — С. 336—340.

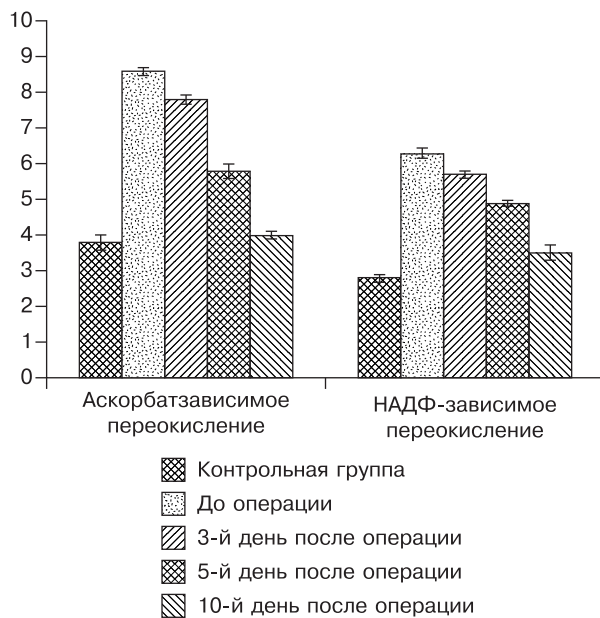


Рис. 1. Уровень содержания перекисей липидов (в нмоль на 1 мг белка) в мембранах эритроцитов у больных ЭП ($n = 12$).

6. Современные методы в биохимии /Под ред. В. Н. Орехович. — М., 1977.
7. Степная Е.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. и др. Роль нарушений структуры мембраны и метаболизма эритроцитов в развитии анемии у больных со злокачественными новообразованиями // Гематол. и трансфузиол. — 2003. — Т. 48, № 5. — С. 11—17.
8. Brunetti E., Mark R. Cystic echinococcosis // Med. J. — 2004. — Vol. 5. — N 3. — P. 45—51.
9. Halliwell B., Gutteridge J.M. — Free Radicals in Biology and Medicine. — Oxford, 1999.
10. Lambeth J.D., Ryu S.H. // Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes / Eds D.E. Vance, J.E. Vance. — Amsterdam, 1996.
11. Limber G.R., Davie R.F., Haker A.M. - Acrylamide gel electrophoresis studies of human erythrocyte membrane // Blood — 1970. — Vol. 36. — N 2. — P. 111—118.
12. Lowry N.J., Rosenbogh, A.J., Farr A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 153, N 1. — P. 256—275.
13. Palsdottir H., Hunte C. Lipids in membrane protejn structures // Biochim Biophys Acta. — 2004. — Vol. 1666. — P. 2—8.

Поступила 04.06.12

Сведения об авторах:

Зангинян Асмик Владимирович, науч. сотр. лаб. мембранологии, e-mail: hzang@mail.ru; **Казарян Гаяне Суреновна**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. мембранологии, e-mail: gaykaz70@mail.ru