

УДК: 577.125:57.044:546.732

### Склад фосфоліпідів клітин крові, печінки та головного мозку тварин при тривалій дії етанолу

Л.М.Дереча<sup>1</sup>, В.В.М'ясоєдов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харківський науково-дослідний інститут судових експертиз імені М.С.Бокаріуса (Харків, Україна)

<sup>2</sup>Харківський державний медичний університет (Харків, Україна)

Викладено результати досліджень складу фосфоліпідів клітин крові, печінки і головного мозку експериментальних тварин при тривалій дії етанолу. Встановлено, що при тривалій дії етанолу спостерігаються зміни питомої ваги фосфоліпідів порівняно з контрольною групою, причому більш значущі зміни фосфоліпідного складу стосувалися найбільш метаболічно активних фракцій фосфоліпідів – фосфатидилінозитулу і фосфатидилсерину, а також лізоформ фосфоліпідів, що можна пояснити зміною співвідношення процесів біосинтезу і деградації фосфоліпідів.

Ключові слова: *фосфоліпіди, дія етанолу на організм.*

#### Вступ

Вивчення порушень, що виникають при дії етанолу на організм людини, обумовлено нагальною потребою часу (Гулий, 2000; Зейтц, 2001; Куценко, 2003; Kushnir et al., 2004). Зростаючий інтерес фахівців різних галузей науки до дослідження механізму дії етанолу на організм експериментальних тварин і людини (Мешишен, Пішак, 1994; Шипулін, 2001; Carrasco et al., 2002) викликаний недостатньою вивченістю деяких сторін впливу етанолу, зокрема, на склад біологічних мембран.

Мембранотропні ефекти є однією з провідних ланок у реалізації впливу етанолу на біологічні системи (Шабанов, 2002; Кушнерова, Лесникова, 2003; Семіна и др., 2003).

Згідно з однією з найбільш відомих гіпотез, так званою «мембранною гіпотезою», етанол діє на мембрану дестабілізуюче, змінюючи фізичні властивості її ліпідних компонентів таким чином, що підвищується «рідкість» мембрани (Шабанов, 2002). Існують дані, що ефекти етанолу обумовлені його взаємодією із специфічними рецептивними полями клітинних мембран (Tabakoff, Hoffman, 1987). Дія етанолу на білки клітинних мембран, очевидно, пояснюється його прямими ефектами на ліпідний бішар.

Молекули етанолу можуть послабляти сили притягання між молекулами ліпідів у клітинній мембрані в такий спосіб, що останні більш вільно рухаються в межах бішару. Мембрана при цьому втрачає свою жорсткість і стає менш в'язкою і більш плинною. Показано, що середні та високі дози етанолу значно підвищують «плинність» ліпідів клітинних мембран (Hitzemann et al., 1986). Крім того, етанол може взаємодіяти з довголанцюговими жирними кислотами з утворенням етилових ефірів. Ці метаболіти здатні викликати більш потужну дезорганізуючу дію на клітинну мембрану, ніж сам етанол. У зв'язку з цим припускають, що вплив етанолу порушує функціонування ліпідного бішару клітинних мембран (Топорков, 2003), основними структурними компонентами якого є фосфоліпіди, зокрема, фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилінозитол (ФІ), кардіоліпін (КЛ), сфінгомієлін (СМ), лізоформи гліцерофосфатидів (ЛФХ, ЛФЕА).

Змінення властивостей і, можливо, будови ліпідного бішару мембран, що спостерігається після введення великих доз алкоголю, видається важливою для пояснення розвитку толерантності та алкогольної залежності, що лежать в основі розвитку алкоголізму (Шабанов, 2002).

Фосфоліпіди (ФЛ) виконують функції біологічних ефекторів, регуляторів, медіаторів, беруть участь практично у всіх найважливіших фізіологічних процесах (імунній відповіді, передачі нейрональної інформації, регуляції судинного і м'язового тону, гемостазу, запалення та ін.), що відбуваються в організмі, та у біохімічних реакціях у клітинах тварин і людини. ФЛ є субстратом ПОЛ, зміни якого лежать в основі багатьох патологічних процесів. З мембранними ФЛ пов'язані такі процеси, як проникність, рецепція, ферментативний каталіз, вільнорадикальне окиснення, характер яких багато в чому залежить від функціонального стану організму (Day, Levy, 1969).

Літературні дані щодо стану біологічних мембран і мембранних процесів при дії етанолу є досить суперечливими (Подымова, 2001; Сторожок и др., 2001; Яковенко и др., 2003; Carrasco et al., 2002). Так, С.О.Сторожок із співавт. вважають, що у механізмі розвитку толерантності живих організмів до дії етанолу важливу роль відіграють характерні фізико-хімічні зміни в біологічних мембранах. Ці зміни ідентичні як для мембран бактеріальних клітин, так і для мембран клітин ссавців, у тому числі людини, та не залежать від тканинної приналежності клітин – кров, печінка, центральна нервова система. Виявлено, що тривала дія етанолу приводила до зміни трансмембранного розподілу ФЛ в еритроцитах свиней: значно збільшувався вміст ФХ та зменшувався вміст СМ; змін в розподілі ФЕА і ФС виявлено не було (Сторожок и др., 2001).

З огляду на дані літератури щодо органотропності етанолу нами проведені експерименти із з'ясування його впливу на клітини крові, печінки і головного мозку експериментальних тварин.

Метою роботи було дослідження фосфоліпідного складу клітин деяких органів і тканин експериментальних тварин при тривалій дії етанолу.

### Методика

В експерименті було використано 120 щурів лінії WAG/G LacSto. Дослідження проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (European convention ..., 1986). Експериментальним тваринам через зонд у шлунок вводили 30%-й розчин етанолу (5 г/кг маси тіла) згідно з (Амбрушкевич, Бушма, 2001) щоденно в той самий час натще протягом 30 діб; контрольні тварини одержували аналогічний об'єм фізіологічного розчину; умертвіння тварин здійснювали під ефірним наркозом. У щурів експериментальної та контрольної груп після декапітації брали кров, печінку і головний мозок.

Зважаючи на наявні в літературі дані про можливий мембранотропний характер і дані про органотропність дії етанолу в організмі експериментальних тварин (Груздева, Высокогорский, 1984; Шабанов, 2002), досліджували особливості фосфоліпідного складу клітин крові, печінки та головного мозку експериментальних тварин (ФІ, ФС, ФХ, СМ, ЛФХ, ФЕА, ЛФЕА, КЛ).

Визначення фракцій фосфоліпідів проводили методом двомірної тонкошарової хроматографії на силікагелі. Результати виражали в процентах від загальної кількості фосфоліпідних фракцій, що вивчали. При дослідженні фосфоліпідного складу клітин крові, печінки і головного мозку визначали вміст ФІ, фосфатидилсерину (ФС), ФХ, СМ, ЛФХ, ФЕА, ЛФЕА, КЛ. Для аналізу використовували еритроцити, відмиті від плазми розчином 0,14 М NaCl при 3–4-кратному центрифугуванні. Наважку печінки і головного мозку гомогенізували в розчині 0,14 М NaCl у ручному гомогенізаторі. Екстракцію ліпідів проводили за методом E.G.Bligh, W.D.Dyer (Bligh, Dyer, 1959). Розчинник – хлороформ – вилучався із ліпідного екстракту в потоці азоту. Розділення ліпідів проводили методом двомірної тонкошарової хроматографії на силікагелі. Ідентифікацію фосфоліпідів проводили з використанням еталонних речовин і речовин для якісного визначення. Кількісне визначення фосфоліпідів проводили за неорганічним фосфором (Кирхнер, 1981, Биологические мембраны, 1990).

Статистичний аналіз проводили за допомогою пакета "Statistica V.6.0". Для перевірки гіпотези про рівність генеральних середніх двох незалежних вибірок груп використовували статистичний t-критерій Стьюдента з попереднім визначенням нормальності розподілу варіант (Лакин, 1990).

### Результати

При дослідженні особливостей складу основних мембранних ліпідів – фосфоліпідів – встановлено зміну співвідношень фракцій фосфоліпідів клітин крові, печінки і головного мозку при тривалій (протягом 30 діб) дії етанолу у тварин експериментальної групи порівняно з контролем. У клітинах крові відзначали зміну питомої ваги ЛФХ, ЛФЕА, ФІ, ФС, ФХ, СМ, ФЕА, в клітинах печінки і головного мозку – ЛФХ, ЛФЕА, КЛ, ФІ, ФС, ФЕА, ФХ, СМ порівняно з контрольною групою (табл. 1).

Таблиця 1.

Склад фосфоліпідів клітин крові, печінки і головного мозку тварин при тривалій дії етанолу ( $M \pm m$ ) (%)

Клітини органів	Група тварин	Показники							
		ФЕА	ФХ	СМ	ФС	ЛФЕА	ЛФХ	ФІ	КЛ
Кров	контроль	25,8±1,9	43,9±1,8	12,2±0,7	9,3±0,8	1,4±0,4	1,1±0,3	6,3±0,5	–
	експеримент	15,3±2,8*	61,1±2,9*	9,5±1,2*	5,2±1,3*	3,4±0,5*	2,3±0,7*	3,2±0,3*	–
Печінка	контроль	24,2±1,7	38,8±1,8	8,0±1,4	8,8±0,8	2,1±0,3	3,7±0,2	5,3±0,4	9,1±1,1
	експеримент	33,1±3,1*	25,2±1,7*	11,8±0,4*	5,7±1,4*	5,8±0,9*	5,1±0,7*	2,1±0,3*	11,2±0,8*
Головний мозок	контроль	27,8±1,7	39,1±1,8	7,0±0,6	8,1±0,6	2,3±0,4	2,9±0,3	5,9±0,3	6,9±0,5
	експеримент	35,2±1,4*	21,0±1,3*	11,3±0,6*	13,9±1,1*	4,1±0,5*	4,0±0,6*	2,4±0,7*	8,7±0,6*

Примітка. \* –  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ .

Так, після введення протягом 30 діб розчину етанолу в клітинах крові рівень ФС і ФІ значно знижувався порівняно з контролем (майже на 50%), а рівень лізоформ фосфоліпідів (ЛФЕА, ЛФХ) підвищувався у середньому на 55,5%. Крім того, спостерігали підвищення рівня ФХ на 28,2% і зниження рівнів СМ і ФЕА у середньому на 31,4%.

За дії етанолу виявлено також зниження співвідношення СМ/ФХ у клітинах крові на 44,2%, підвищення на 56,0% в клітинах печінки і на 66,7% в клітинах головного мозку експериментальних тварин.

Отже, при тривалій дії етанолу встановлено зміну співвідношень фракцій фосфоліпідів клітин крові, печінки і головного мозку порівняно з контролем: в клітинах крові підвищувався рівень ФХ, ЛФЕА, ЛФХ, знижувався рівень ФС, ФІ, СМ і ФЕА; у клітинах печінки спостерігали зниження вмісту ФІ, ФС, ФХ і підвищення ЛФЕА, СМ, ЛФХ, КЛ; у головному мозку збільшувалася кількість фракцій ФС, ФЕА, СМ, КЛ, ЛФЕА і ЛФХ та зменшувалася кількість фракцій ФХ і ФІ. При тривалій дії етанолу більш значущі зміни фосфоліпідного складу стосувалися найбільш метаболічно активних фракцій фосфоліпідів – ФІ і ФС, а також лізоформ фосфоліпідів – ЛФЕА і ЛФХ.

#### Узагальнення

Отже, при тривалій дії етанолу в клітинах крові, печінки і головного мозку відзначали зміну питомої ваги ЛФХ, ЛФЕА, ФІ, ФС, ФХ, КЛ, СМ, ФЕА порівняно з контрольною групою. При тривалій дії етанолу більш значущі зміни фосфоліпідного складу стосувалися найбільш метаболічно активних фракцій фосфоліпідів, що можна пояснити зміною співвідношення процесів біосинтезу і деградації фосфоліпідів.

Нейтральні фосфоліпіди, такі як СМ і ФХ, локалізуються на зовнішній стороні мембрани в сполученні з невеликою кількістю ФЕА. Внутрішня (цитозольна) частина її складається в основному з ФЕ, а також ФС і ФІ – аніонних (кислих) фосфоліпідів, а також невеликої кількості ФХ і СМ.

Цілком ймовірно, що збереження нормальних кількісних співвідношень між вказаними групами фосфоліпідів є наслідком метаболічних «перебудов» обміну фосфоліпідів і компенсаторно-приспосовувальним механізмом, спрямованим на забезпечення нормального функціонування систем організму експериментальних тварин і людини в умовах тривалої дії етанолу.

Значне підвищення питомої ваги лізоформ фосфоліпідів дало підставу для припущення щодо стимуляції вільнорадикальних процесів у тварин за умов тривалої дії етанолу. Підсилення процесів ПОЛ за умов тривалої дії етанолу призводить до зниження стабільності мембран, про що свідчать дані, які характеризують зміни рівнів і співвідношення фракцій фосфоліпідів. Підвищення рівня лізоформ фосфоліпідів (ЛФХ, ЛФЕА) в експериментальних тварин, порушення їх обміну, а також дисбаланс інших фосфоромісних ліпідів (КЛ, ФІ, ФС, ФХ, СМ) можуть лежати в основі та бути наслідком структурно-функціональних змін, що відбуваються в клітинах крові, печінки і головного мозку.

Одержані результати свідчать про дестабілізацію мембран клітин крові, печінки і головного мозку при впливі етанолу, що може бути наслідком безпосереднього, «первинного» впливу етанолу на біологічну мембрану, а також результатом підсилення під впливом етанолу процесів вільнорадикального окиснення, зокрема перекисного окиснення ліпідів.

#### Список літератури

- Амбрушкевич Ю.Г., Бушма М.И. Биохимические механизмы, ответственные за развитие гепатотоксичности этанола // Достижения медицинской науки Беларуси. – 2001. – Вып.6. – С. 34–35.
- Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж.Финделя, У.Эванза. – М.: Мир. – 1990. – 424с.
- Груздева К.Н., Высокогорский В.Е. Роль этанола как дестабилизатора субклеточных мембран и метаболических реакций в процессе развития алкогольной зависимости // Биологические основы алкоголизма. – М., 1984. – С. 59–64.
- Гулий М.Ф. Про метаболічні порушення та корекція їх в організмі людини за алкоголізму та наркоманії // Український біохімічний журнал. – 2000. – Т.72, №6. – С. 103–106.
- Зейтц Г. Алкогольная болезнь печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – Т.11, №4. – С. 62–63.
- Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Пер с нем. – М.: Мир, 1981. – Т.1. – 616 с., Т.2. – 527с.
- Куценко С.А. Основы токсикологии // Российский биомедицинский журнал. – 2003. – Т.4. – С. 119–128.
- Кушнерова Н.Ф., Лесникова Л.Н. Влияние хаурантина на процессы восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов после поражения этиловым спиртом // Наркология. – 2003. – №5. – С. 25–28.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352с.
- Мецишен І.Ф., Пішак В.П. Обмін етанолу і біохімічні основи алкоголізму: Навчальний посібник. – Чернівці: Медінститут, 1994. – 53с.
- Подымова С.Д. Патогенетическая роль эссенциальных фосфолипидов в терапии алкогольной болезни печени // Consilium medicum. – 2001. – Т.3, №3. – С. 11–15.

- Семина И., Файзуллин Д., Ступишина Е. Антиалкогольная активность ноотропных препаратов и физические свойства биомембран // Структура и динамика молекулярных систем. – 2003. – Вып.Х, Ч.2. – С. 246–249.
- Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // Вопросы медицинской химии. – 2001. – №2. – С. 8–10.
- Топорков А.С. Применение эссенциальных фосфолипидов в терапии алкогольной болезни печени // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т.11, №4. – С. 18–21.
- Шабанов П.Д. Основы наркологии. – СПб.: Лань, 2002. – 556с.
- Шипулин В.П. Алкогольная болезнь печени // Здоров'я України. – 2001. – №4. – С.3.
- Яковенко Э.П., Григорьев П.Я., Агафонова Н.А. Метаболические заболевания печени: проблемы терапии // Фарматека. – 2003. – №10. – С. 17–23.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol.37, №8. – P. 911–917.
- Carrasco M.P., Jimenezlopez J.M., Segovia J.L., Marco C. Comparative study of the effects of short- and long-term ethanol treatment and alcohol withdrawal on phospholipid biosynthesis in rat hepatocytes // Comparative Biochemistry and Physiology: Biochemistry and Molecular Biology. – 2002. – Vol.131. – P. 491–497.
- Day C.E., Levy R.S. A generalized functional role for phospholipids // J. Theoret. Biol. – 1969. – Vol.22, №3. – P. 541–542.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, Council of Europe. – 1986. – 18.III. – №123. – 52p.
- Hitzemann R.J., Schueler H.E., Graham-Brittain C., Kreishman G.P. Ethanol-induced changes in neuronal membrane order. An NMR study // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol.859. – P. 189–197.
- Kushnir E.A., Lovat M.L., Obukhova M.F. Polyoxidonium in the immunological correction of alcoholic motivation // Immunology. – 2004. – №2. – P.87.
- Tabakoff B., Hoffman P.L. Biochemical pharmacology of alcohol // Psychopharmacology: The third generation of progress / Ed. by H.Y.Meltzer. – N.Y.: Raven Press, 1987. – P. 1521–1526.

**Состав фосфолипидов клеток крови, печени и головного мозга животных при  
длительном действии этанола  
Л.Н.Дереча, В.В.Мясоедов**

Изложены результаты исследований состава фосфолипидов клеток крови, печени и головного мозга экспериментальных животных при длительном действии этанола. Установлено, что при длительном действии этанола наблюдаются изменения удельного веса фосфолипидов по сравнению с контрольной группой, причем более значимые изменения фосфолипидного состава касались наиболее метаболически активных фракций фосфолипидов – фосфатидилинозитола и фосфатидилсерина, а также лизоформ фосфолипидов, что можно объяснить изменением соотношения процессов биосинтеза и деградации фосфолипидов.

Ключевые слова: *фосфолипиды, действие этанола на организм.*

**Phospholipids composition of blood, liver and brain cells of animals under long-term ethanol  
influence  
L.N.Derecha, V.V.Myasoedov**

The results of phospholipids composition study of blood, liver and brain cells under long-term ethanol influence are presented. It is established that there are the changes of the specific gravity of phospholipids under long-term ethanol influence as compared to a control group, more essential changes of phospholipids composition are in the most metabolic active fractions of phospholipids – phosphatidylinositol and phosphatidylserine and also lysoforms of phospholipids, that it is possible to explain by the change of correlation of processes of biosynthesis and degradation of phospholipids.

Key words: *phospholipids, action of ethanol on organism.*

---

Представлено О.Ю.Петренко  
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко