

Кузьменко І. В., Даценко З. М.,
Донченко Г. В., Дмитренко Т. В.,
Кліменко К. П., Нечитайло Л. О.,
Кривенко О. М.

ЗМІНИ ЛІПІДНОГО СКЛАДУ ТА АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ У МІКРОСОМАХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ВІТАМІНУ Е ТА ЙОГО ПОХІДНИХ

Вітамін Е при пероральному введенні щурам практично не впливає на каталазну активність цитозолу печінки та крові тварин, призводить до підвищення ГР-активності цитозолу. При використанні похідної сполуки вітаміну Е з вкороченим до C_6 бічним ланцюгом підвищується каталазна активність крові. Вкорочення бічного ланцюга до C_1 дає більш виражений ефект. ГР-активність цитозолу достовірно зростає при застосуванні всіх досліджуваних препаратів. Каталазна активність залежить від забезпеченості вітаміном Е та його похідними в крові, де її пул найвищий, і незмінна в цитозолі печінки. ГР, навпаки, зростає в цитозолі, тоді як ГП більш чутлива в мікросомальній фракції. Дія похідної сполуки вітаміну Е з C_6 у бічному ланцюзі мало чим відрізняється від дії вітаміну Е, за винятком більшої активації К крові. Під дією досліджуваних препаратів змінюється вміст фосфоліпідів, холестеролу, жирних кислот. Використані нами препарати подібно α -токоферолу мають протекторну дію, стабілізуючи ліпідний бішар мембран, запобігаючи порушенню синтезу фосфоліпідів, та беруть участь у регуляції біосинтезу ейкозаноїдів.

Антиоксидантний захист (АОЗ) в організмі здійснюється антиоксидантними ферментними системами, а також антиоксидантами неферментативної природи як ендо-, так і екзогенними, що синергічно взаємодіють. До ензиматичної системи антиоксидантного захисту належать такі ферменти: супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), каталаза (К) та пероксидаза (П).

На думку Кулінського В. І. та його співавторів [1], існує кілька ліній АО захисту клітин від активних форм кисню, а саме: а) СОД; б) К, ГП; в) ГП і глутатіонтрансфераза (ГТР), які послідовно відновлюють H_2O_2 та органічні гідропероксиди. Слід додати ще й четверту лінію — незараження вторинних продуктів пероксидації (ГТР, гліоксилази, формальдегід, дегідрогеназа).

Цікаво, що глутатіон бере участь в усіх лініях захисту, тому є найважливішим у АО захисті організму, тим більше, що відомо про його високу спорідненість з H_2O_2 і це дає йому змогу захищати клітину навіть від незначних кількостей надлишкових перекисів. Глутатіон та глутатіонзалежні ферментні системи беруть також участь у захисті клітин від окиснення SH-груп, в обміні ейкозаноїдів та простагландинів, впливають на біосинтез білка та нуклеїнових кислот, метаболізм ксенобіотиків, являються резервом

цистеїну в організмі, підвищують резистентність клітин до шкідливих впливів, регулюють проліферацію клітин, глутатіон входить до складу хроматину і саме ГТР грає роль ферменту репарації ДНК [1].

Раніше нами вивчався вплив похідних вітаміну Е на неферментативні ланки (АОЗ) організму. Встановлено, що похідна сполука токоферолу з вкороченим бічним ланцюгом не поступається йому за дією на швидкість утворення продуктів, що реагують із тіобарбітуровою кислотою, як в умовах *in vitro* [2], так й *in vivo* [3], зменшує кількість дієнових кон'югатів, що утворюються при нестачі вітаміну Е [3], нормалізує вміст ліпідів у досліджуваних об'єктах [3]. Крім того, цей препарат сприяє підвищенню біосинтезу, вмісту убіхінону та адекватності його функціонування, сприяє збереженню вмісту вітаміну Е, можливо, зменшуючи його витрати в організмі [3].

У зв'язку з тим, що вітамін Е, як припускають, може впливати на модифікацію ліпідної структури мембран та синтез простагландинів через механізми, не пов'язані з його антиоксидантною дією, доцільно було виявити вплив коротколанцюгової (C_6) та безланцюгової (C_1) похідних сполук препаратів вітаміну Е в порівнянні з α -токоферолом на структурні зміни ліпідів у мікросомальних мембранах.

Відомо, що вплив самого вітаміну Е на активність ферментів АО захисту дозозалежний. Тому, різними авторами при використанні різних доз α -Т, отримані неоднозначні результати. Існують дані, що глутатіон та глутатіонзалежні ферменти гальмують витрати вітаміну Е при підвищеному ПОЛ [5], а також, що вітамін Е не змінює глутатіонредуктазну та глутатіонтрансферазну активності [6].

Враховуючи, що основу АОЗ в організмі становить ферментативна система [4], досліджували дію найбільш перспективної в плані високої біологічної активності похідної сполуки вітаміну Е з вкороченим до C_6 бічним ланцюгом в порівнянні з вітаміном Е та безланцюговою похідною (з C_1 замість ізопреноїдного бічного ланцюга) речовиною на активність ГП, ГР, К й антиокиснювальну активність мікосомальної фракції та цитозолу печінки, а також гемолізатів крові щурів.

Вибір ферментів зумовлений ще й тим, що їх дія подібна до дії вітаміну Е. Вони, як і вітамін Е, окрім гальмування процесів ПОЛ, впливають на мутагенез, синтез простагландинів, канцерогенез та ін. [1, 4].

Матеріали та методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Вістар, масою 150—180 г, що утримувалися на повноцінному раціоні віварію. Доступ до корму та води був вільний.

Вітамін Е та його похідні на маслиновій олії в об'ємі 0,2 мл вводили зондом перорально один раз на добу протягом 10 днів. Вітамін Е вводили в кількості 25 мкг/г маси тварин, досліджувані похідні — в еквімолярних до нього кількостях. Доза була вибрана із врахуванням результатів попередніх досліджень дозозалежності дії вітаміну Е як на процеси біоенергетики, так і перекисного окиснення ліпідів [7]. Контролем слугували інтактні щури, що утримувалися на раціоні віварію.

Щурів забивали шляхом декапітації. Кров збирали у пробірки, змочені антикоагулянтом — гепарином, відбирали аліквоту у холодний фізіологічний розчин, перемішували та центрифугували при 2 тис. об./хв. упродовж 10 хв.

Процедуру відмивання осаду еритроцитів повторювали до одержання безбарвного супернатанту. З еритроцитарної маси, обробленої ЕДТА, готували гемолізати для визначення ГР і ГП-активностей. Для визначення К-активності з гемолізатів додатково видаляли гемоглобін, застосовуючи суміш хлороформ : етанол (2 : 1) з подальшим центрифугуванням (4 тис. об./хв., 20 хв.) при охолодженні [8].

Видалення печінки, її промивання, подрібнення, підготовка гомогенатів та отримання фракцій проводилось на холоді. Мікосомаль-

ну фракцію одержували за методом [9]. Цитозолем клітин печінки вважали надосадову фракцію після видалення мікосом. Активність ферментів антиоксидантної дії ГР, ГП та К визначалась у кров'яному гемолізаті, мікосомальній фракції та цитозолі печінки щурів.

ГП-активність (глутатіон : H_2O_2 оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.9) каталізує окисно-відновну реакцію між глутатіоном та органічними пероксидами. Визначалась за кількістю відновленого глутатіону, що не прореагував з перекисом водню [10]. Фермент відповідає за розклад органічних гідропероксидів та ліпоперекисів (жирних кислот, ацилгліцеридів, стероїдів, простагландинів).

ГР-активність (NADPH₂ : глутатіонпероксидаза, КФ 1.6.4.2) каталізує за участі NADPH перетворення окисної форми глутатіону у відновлену. Визначалась за методом Власова [10].

К-активність (КФ 1.11.1.6) визначалась по зникненню H_2O_2 , що розкладається, за кількістю залишків перексиду водню за жовтим забарвленням при реакції з молібдатом натрію [11]. Фермент каталізує розклад перекису водню на кисень та воду, а значить, являється ферментом утилізації гідроперекису та O_2 .

Ліпідні екстракти отримували за методом [12]. Вміст індивідуальних фосfolіпідів: фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну (ФЕА), сфінгомієліну (СМ), дигідрофосфатидилгліцериду (ДФГ), фосфатидилгліцериду (ФГ), лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), лізофосфатидилетаноламіну (ЛФЕ), фосфатидної кислоти (ФК) визначали за кількістю неорганічного фосфору за методом Васьковського [13], хроматографічне розділення індивідуальних фосfolіпідів проводили за методом двомірної тонкошарової хроматографії [14]. Вміст жирних кислот визначали хроматографічним методом за допомогою газорідинного хроматографа з попереднім метилюванням зразків за методом [15].

Результати дослідження

Як видно з табл. 1, у тварин контрольної групи найвища каталазна активність виявляється в гемолізатах крові, а в цитозолі та мікосомальній фракції вона майже одного порядку і на два порядки менша, ніж в гемолізатах крові. Це збігається з даними літератури [12] і може свідчити про значні захисні функції кров'яного русла порівняно з печінкою. ГР-активність значно вища в цитозолі порівняно з мікосомальною фракцією, а ГП-активність у крові більш як на порядок нижча, ніж в цитозолі та мікосомальній фракції, де їх активності близькі.

Вітамін Е при пероральному введенні щурам практично не впливає на каталазну активність усіх досліджуваних об'єктів, призводить до під-

Активність ферментативних систем антиоксидантного захисту організму при дії вітаміну Е та його аналогів, ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Групи	Ферментна активність							
	Каталазна			Глутатіон редуктазна		Глутатіон пероксидазна		
	Кров, мМ/хв/мг Нв	Цитозоль, мМ/хв/мг білка	Мікосоми, мМ/хв/мг білка	Цитозоль, ОП/хв/мг білка	Мікосоми, ОП/хв/мг білка	Кров, ОП/хв/мг Нв	Цитозоль, ОП/хв/мг білка	Мікосоми, ОП/хв/мг білка
Контроль	786,8±112 (n=5)	0,51±0,15 (n=6)	0,33±0,08 (n=7)	0,56±0,19 (n=6)	0,033±0,008 (n=7)	0,46±0,05 (n=9)	7,14±0,73 (n=6)	8,00±1,13 (n=7)
Вітамін Е (30 мг/кг маси)	834±104,2 (n=6)	0,55±0,15 (n=6)	0,34±0,10 (n=7)	0,86±0,12 (n=6)	0,036±0,007 (n=8)	0,48±0,09 (n=8)	7,98±0,63 (n=6)	8,88±1,69 (n=8)
С ₆ ацетат	1090,2±234,4 (n=6)	0,49±0,05 (n=6)	0,26±0,05 (n=7)	0,84±0,29 (n=7)	0,038±0,006 (n=7)	0,55±0,08 (n=8)	6,44±0,80 (n=6)	8,55±1,16 (n=7)
С ₁ -ол	1254,2±402,4 (n=6)	0,48±0,07 (n=6)	0,23±0,0037 (n=7)	0,71±0,13 (n=6)	0,027±0,005 (n=8)	0,051±0,07 (n=7)	7,28±1,70 (n=6)	10,10±1,57 (n=7)

вищення ГР-активності в цитозолі. Відмічається також тенденція до активації ферменту в мікосомі. Що стосується ГП-активності після прийому препарату, то вона не змінюється в крові і дещо зростає в цитозолі та мікосомальній фракції.

При використанні похідної речовини вітаміну Е з вкороченим до С₆ бічним ланцюгом спостерігається підвищення каталазної активності крові. Вкорочення ланцюга до С₁ призводить до більш вираженого впливу на цей показник в крові. Але в цитозольній фракції вказана вище активність майже не змінюється, а в мікосомальній фракції навіть має тенденцію до зниження при введенні обох досліджуваних препаратів, порівняно з дією фармакопейного вітаміну Е. Зростання каталазної активності в крові та зниження її в мікосомальній фракції може свідчити про її вихід з досліджуваних компонентів у кров.

Лише ГР-активність цитозолу достовірно зросла порівняно з контролем при використанні всіх досліджуваних препаратів, але найменше — при застосуванні похідної речовини вітаміну Е без бічного ланцюга.

Що стосується ГП-активності досліджуваних об'єктів, то вона залишається незмінною в крові, цитозолі та мікосомальній фракції печінки щурів, не тільки після вживання ними вітаміну Е, але й похідної з С₆ та С₁ у бічному ланцюзі за винятком незначної активації ферментативної активності після отримання токоферолу без бічного ланцюга.

Якщо проаналізувати зміну активностей досліджуваних об'єктів (кров, цитозоль, мікосомальна фракція), то можна зробити висновок, що каталазна активність більш чутлива до забезпеченості вітаміном Е та його похідними в крові, де її пул найвищий, і незмінна в цитозолі печінки, ГР, навпаки, зростає в цитозолі, а ГП більш чутлива в мікосомальній фракції печінки щурів.

Таким чином, можна сказати, що вплив похідної сполуки вітаміну Е з С₆ у бічному ланцюзі мало чим відрізняється від дії вітаміну Е, за винятком дещо більшого впливу на каталазну активність крові в бік її активації, похідна з С₁ у бічному ланцюзі проявляє ще більшу активність у даному випадку, але ця сполука менш активна порівняно з вітаміном Е при визначенні ГР цитозолу та мікосом.

При дослідженні впливу вказаних препаратів на вміст мембранних фосfolіпідів, кількість та склад жирних кислот у структурних фосfolіпідах мікосомальних мембран було встановлено, що під дією досліджуваних препаратів змінюється вміст фосfolіпідів, холестеролу, кількість та склад жирних кислот (рис. 1).

При цьому знайдено достовірне зменшення рівня лізоформфосфатидилхоліну (ЛФХ) та фосфатидилетаноламіну (ФЕА) майже в 2 рази, дифосфатидилгіцириду (ДФГ) — в 1,5 рази, холестеролу в 1,2 рази, але похідна α -токоферолу з вкороченим до С₆ бічним ланцюгом має деяку перевагу в цих процесах (рис. 1). Досліджувані похідні α -токоферолу корегують зміни рівня деяких фосfolіпідів при зниженні рівня вітаміну Е в організмі, а саме — підвищують рівень ФЕА та знижують майже у 2 рази кількість ДФГ.

При дослідженні складу та рівня жирних кислот у структурі фосfolіпідів мікосомальних мембран печінки було виявлено (рис. 2) зменшення рівня мононенасичених жирних кислот — пальмітинової (С_{16:0}), стеаринової (С_{18:0}) і збільшення рівня ненасичених — олеїнової (С_{18:1}), лінолевої (С_{18:2}), арахідонової (С_{20:4}), а також поліненасичених омега-3 жирних кислот — ейкозапентаєнової — (С_{20:5}), докозапентаєнової — (С_{22:5}), докозагексаєнової — (С_{22:6}). Крім цього, досліджувані С₁ і особливо С₆ порівняно з α -токоферолом мають тенденцію до деякого підвищення ейкозаноїдів, можливо, за рахунок більш легкого проникнення в мембранні структури або, як мо-

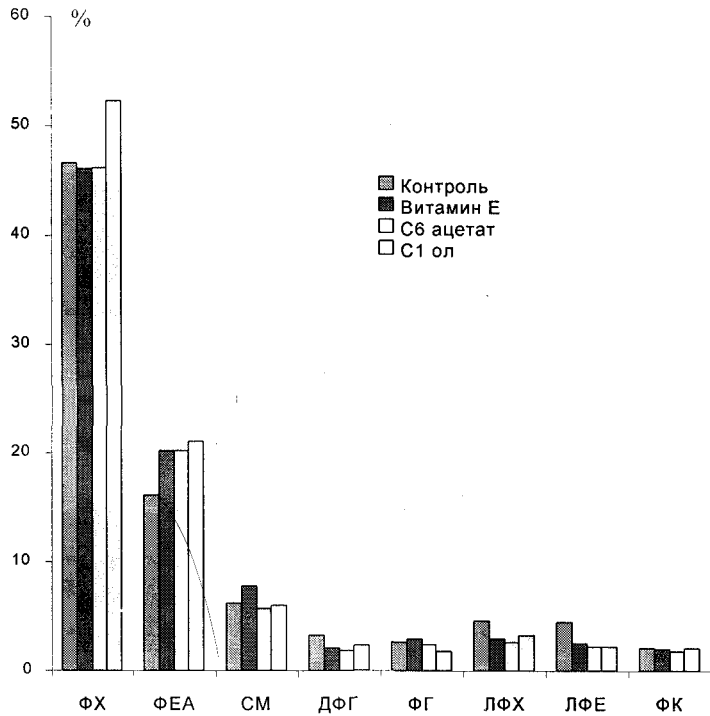


Рис. 1. Вміст фосфоліпідів (%) у мікросомальній фракції печінки щурів ($n = 8$, $M \pm m$, відмінності вірогідні при $p < 0, 05$)

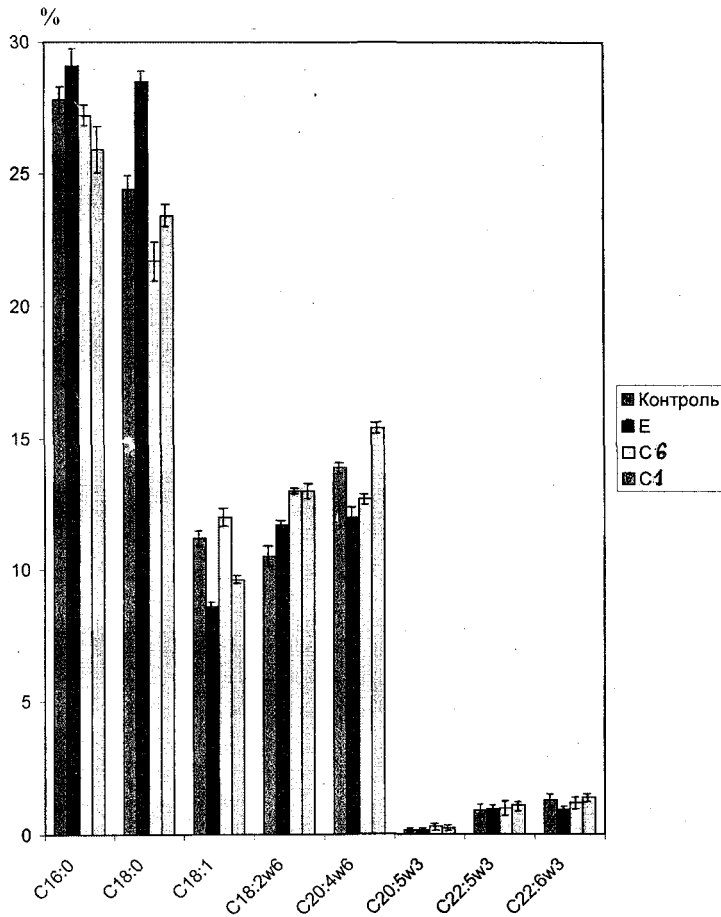


Рис. 2. Вміст жирних кислот у фосфоліпідних мікросомальних фракціях печінки після дії α -токоферолу та його похідних (% від загальної суми)

жна припустити, беруть участь у регуляції біосинтезу ейкозаноїдів.

Проведені дослідження показали, що використані нами препарати, подібно до α -токофе-

ролу, мають протекторну дію, стабілізуючи ліпідний бішар мембран, запобігають порушенню синтезу фосфоліпідів, а також беруть участь у регуляції біосинтезу ейкозаноїдів.

1. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Усп. совр. биол.— 1990.— Т. 110.— № 1(4).— С. 20—33.
2. Кузьменко И. В., Куница Н. И., Донченко Г. В. // Укр. биохим. журн.— 1996.— Т. 65.— № 3.— С. 94—99.
3. Куница Н. И., Кузьменко И. В., Алексеев С. М., Захарова Е. И., Донченко Г. В. // Биохимия.— 1993.— Т. 58.— № 11.— С. 1709—1713.
4. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. // Укр. биохим. журн.— 1989.— Т. 61.— № 2.— С. 14—27.
5. Graham K. S., Reddy C. C., Scholz R. W. // Lipids.— 1989.— Vol. 24.— N 11.— P. 909—914.
6. Golding C. E., Hu W. L., Rao N. R. // EXS.— 1982.— Vol. 62.— P. 251—256.
7. Кузьменко И. В., Куница Н. И., Клименко Е. П., Донченко Г. В. // Тез. докл. конф. "Проблемы микробного синтеза витаминов и их производных".— Ташкент, 1990.— С. 14—18.
8. Дубинина Е. Е., Ефремова Л. Н., Софронова Л. Н. Сравнительный анализ активности супердисульфатазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии // Лаб. дело.— 1988.— № 8.— С. 16—19.
9. Schenkman J. B., Citty D. L. // Methods of Enzymology.— 1974.— 52, part C.— P. 83—89.
10. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Переслягина И. А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело.— 1990.— № 8.— С. 19—22.
11. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело.— 1991.— № 10.— С. 9—13.
12. Folch L. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem.— 1975.— N 226.— P. 447—509.

*Kuzmenko I. V., Datsenko Z. M., Donchenko G. V.,
Dmytrenko T. V., Klimenko K. P., Nechytailo L. O., Kryvenko O. M.*

THE CHANGES IN LIPID COMPOSITION AND ACTIVITY OF ANTIOXIDATION PROTECTION ENZYMES IN RAT LIVER AND BLOOD UNDER THE INFLUENCE OF VITAMIN E AND ITS DERIVATIVES

Vitamin E at peroral administration to the rats failed to render the essential action to the catalase activity of rat liver cytosole and blood, while provided for GR activity increase in the cytosole. At application of vitamin E derivative with the shortened side chain to C₆ the increase in blood catalase activity was observed. The shortening of the side chain to C₁ revealed more pronounced effect. Cytosole GR activity reliably raised under all estimated preparations. The catalase activity is more sensitive to the vitamin E and its derivatives utilization in the blood where its pool was the highest, and invariable in the liver cytosole, ass for GR, it increased in the cytosoles, while GP showed itself as more sensitive in the microsomal fraction. The effect of vitamin E derivative with C₆ in the side chain weakly differed from the vitamin E action excluding higher blood catalase. Under the tested preparations action the content of phospholipids, cholesterol, fatty acids changed. The preparations applied similarly to α-tocopherol had a protective action stabilizing the membrane lipid belayed, preventing the phospholipid synthesis disturbances and participating in the eicosanoids biosynthesis regulation.