

УДК 616.127—005.4:577.161.3

Мхітарян Л. С., Кучменко О. В., Донченко Г. В., Кузьменко І. В.

ВПЛИВ КОРОТКОЛАНЦЮГОВОЇ ПОХІДНОЇ СПОЛУКИ ВІТАМІНУ Е НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КАРДІОМІОЦИТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗУ

У статті наведено результати дослідження впливу похідної сполуки вітаміну Е з вкороченим до С⁶ бічним ланцюгом на структурно-функціональний стан плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу. Встановлено анти-оксидантні властивості, нормалізуючий вплив на ліпідну структуру мембран та функціонування Na⁺, K⁺-АТФази коротколанцюгової похідної сполуки вітаміну Е за умов експериментального атеросклерозу. Все це може свідчити про досить високу мембранопротекторну дію цієї сполуки щодо кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу.

Клітинний гомеостаз при нормальному фізіологічному стані організму може бути змінений під дією як зовнішніх, так і внутрішніх факторів. Для аеробних організмів визначальними є ендогенні рівні природних антиоксидантів і проміжних продуктів окислення різних речовин. Для забезпечення ефективного захисту клітини дуже важливим є повноцінне функціонування антиоксидантних систем цитоплазми та мембран [5, 10].

Вітамін Е — незамінний компонент тваринної клітини та основний жиророзчинний антиоксидант, який захищає біологічні мембрани від окислення. Згідно із сучасними уявленнями мембранотропний ефект вітаміну Е пов'язаний як з проявом його антиоксидантних властивостей, так і з безпосередньою участю в організації структури мембран за рахунок прямої взаємодії його бічного ізофітольного ланцюга з поліненасиченими жирними кислотами фосфоліпідів мембран. Встановлена також протективна дія вітаміну Е щодо АТФаз, зокрема Na⁺, K⁺-АТФази [4, 5, 9, 13].

Відомо, що основними факторами розвитку найбільш розповсюджених на сьогодні захворювань серцево-судинної системи — атеросклерозу, ішемічної хвороби серця та ін. — є порушення ліпідного обміну та стресорні ушкодження. Вважається, що атеросклероз — це локальна патологія судин, і серце при цьому залишається інтактним до останніх стадій розвитку патології. Враховуючи універсальний характер будови та складу біологічних мембран в організмі, важко уявити, щоб в умовах атерогенної гіперхолестеринемії кардіоміоцити та їх мембранний апарат не брали участі в загальному патогенетичному ланцюгу подій, які ведуть до ураження серцево-судинної системи при атеросклерозі та ішемічній хворобі серця.

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження впливу коротколанцюгової похідної сполуки вітаміну Е на структурно-функціональний стан плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу.

Матеріали і методи

Експериментальний атеросклероз моделювали на безпородних кролях масою тіла 2,8—3,0 кг шляхом додавання в раціон тварин холестерину в дозі 0,5 г на 1 кг маси тіла кожного дня упродовж 2 місяців.

Піддослідні тварини були розподілені на такі групи:

- контроль (інтактні тварини);
- тварини з експериментальним атеросклерозом;
- тваринам похідну сполуку вітаміну Е (а-токоферилацетат з укороченим до С⁶ бічним ланцюгом та насиченим на кінці зв'язком) вводили з лікувально-профілактичною метою, тобто тваринам одночасно вводили перорально суспензію холестерину та препарат у дозі 5 мг на 1 кг маси тіла, починаючи з 30-го дня від запровадження гіперхолестеринової дієти; інтервал між введеннями становив 20—30 хв.

У всіх серіях досліджень кількість дослідів та вимірювань кожного показника була не менше 6. В кожний дослід брали міокарди мінімум трьох тварин для гомогенізації тканини та отримання фракції плазматичних мембран кардіоміоцитів. Таким чином, у кожній групі експериментальних тварин використовували не менше 18 кролів.

Експерименти проведені із врахуванням вимог гуманного ставлення до тварин, яких усипляли за допомогою етаміналового наркозу в дозі 30 мг на 1 кг маси тіла внутрішньо.

Фракцію плазматичних мембран гомогенату міокарду одержували із застосуванням диференційного ультрацентрифугування за методом Louis P. J. [15]. Про чистоту отриманого препарату мембран робили висновки на основі визначення активності маркерного ферменту Na^+ , K^+ -АТФази з використанням загальновідомої в літературі методики [3]. Вміст ліпідних компонентів у структурі плазматичних мембран — холестерину, фосфоліпідів, жирних кислот визначали в хлороформ-метанолових екстрактах мембранних структур, отриманих за методом Folch із співавт. [14] з використанням біохімічного автоматичного аналізатора "Express-550" (Ciba-Corning, Великобританія) і діагностичних тест-систем, реагентів фірми.

Інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) визначали за рівнем накопичення первинних та кінцевих продуктів реакції — дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду [11, 12].

Активність Na^+ , K^+ -АТФази вимірювали за приростом у середовищі інкубації неорганічного фосфату, який утворився в результаті ферментативної реакції між ферментом та субстратом — АТФ [3]. Інкубаційне середовище при цьому містило: в 1 мл об'єму — 5 мМ MgCl_2 , 140 мМ NaCl , 40 мМ KCl , 3 мМ АТФ і 50 мМ тріс- HCl (рН 7,4), $t = 37^\circ\text{C}$. Реакцію запускали внесенням в інкубаційну суміш 100 мкг білка мембрани і проводили протягом 10 хв. Концентрацію неорганічного фосфату визначали спектрофотометрично [17].

Кількість білка вимірювали за методом Лоурі [16].

Надслабке світіння реєстрували медичним хемілюмінометром (ХЛМІЦ-01). Інтенсивність хемілюмінесценції гомогенатів у кількості 1 мл досліджували в режимі сумачії при температурі 37°C . Спалах хемілюмінесценції записували самописцем КСП-4 протягом 5 хв при швидкості 720 мм/год. [1].

Результати досліджень оброблено статистично з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Згідно із рідинно-кристалічною моделлю мембранної структури функціонуючі мембрани є двовимірним розчином глобулярних інтегральних білків, диспергованих у рідкому фосфоліпідному матриці. Ступінь молекулярної рухомості (текучості) в середині ліпідної частини мембрани важливий для регуляції активності мембранозв'язаних білків. У свою чергу, текучість мембрани залежить від її ліпідного складу [2, 7].

Як показали проведені дослідження, за умов експериментального атеросклерозу спостерігаються зміни основних класів ліпідів мембран - холестерину та фосфоліпідів (табл. 1). Так, вміст холе-

стерину достовірно збільшується на 50 %, а рівень фосфоліпідів зменшується на 22 % порівняно з контролем. При цьому молярне співвідношення холестерину і фосфоліпідів збільшується в 1,81 раза з $1,25 \pm 0,11$ до $2,27 \pm 0,19$.

Холестерин відіграє роль молекулярного модифікатора мембран, збільшення чи зменшення вмісту якого впливає на текучість мембран, а отже і на процеси, які з ними пов'язані. Згідно з даними літератури, холестерин є також індуктором активації багатьох ферментів; на початкових етапах він може відігравати роль пастки вільних радикалів, проте тривале підвищення рівня холестерину може лежати в основі патологічних станів [2, 7].

Проведені дослідження показали, що експериментальний атеросклероз супроводжується надлишковим накопиченням у мембранах холестерину, в результаті чого змінюється текучість мембран, що разом із зниженням рівня фосфоліпідів не може не впливати на структурно-функціональний стан плазматичних мембран кардіоміоцитів.

Водночас у результаті проведених досліджень було також встановлено накопичення в мембранах жирних кислот (табл. 1), вміст яких достовірно збільшується на 34 % порівняно з контролем, що разом із вже розглянутими змінами рівнів холестерину та фосфоліпідів призводить до зміни фізико-хімічних властивостей плазматичних мембран кардіоміоцитів і може впливати на їх основні властивості — збудливість, провідність, ритмічну діяльність і скоротливу здатність.

На сьогодні переконливо доведено, що вільні радикали беруть безпосередню участь у патогенезі пошкоджень біологічних мембран, наслідками якого є порушення нормального функціонування клітин і чисельні патології в масштабі цілого організму [6, 10].

Відомо, що порушення регуляції процесів ПОЛ відіграє важливу роль в етіології та патогенезі багатьох захворювань, в тому числі і серцево-судинних. Отримані дані свідчать про активацію вільнорадикальних процесів окислення при експериментальному атеросклерозі (табл. 2), на що вказує достовірно зростання в мембранах рівня дієнових кон'югатів на 63 % і малонового діальдегіду — на 77 % порівняно з контролем.

Факт інтенсифікації вільнорадикальних окислювальних реакцій при експериментальному атеросклерозі підтверджується також при застосуванні методу вимірювання інтенсивності спонтанного та індукованого надслабкого світіння (хемілюмінесценції) суспензій мембран, що досліджуються (табл. 2). Так, інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛЦ) достовірно зростає на 61 %, а індукованої ХЛЦ — на 300 % порівняно з контрольними величинами.

Всі ці зміни ліпідної фази мембран не можуть не впливати на функціонування мембранозв'язаних ферментних систем, на що вказує достовірне зниження каталітичної активності основного іонного насоса плазматичних мембран кардіоміоцитів Na^+ , K^+ -АТФази на 49 % в порівнянні з контролем (рис. 1).

Отже, експериментальна гіперхолестеринемія призводить, з одного боку, до значної структурно-

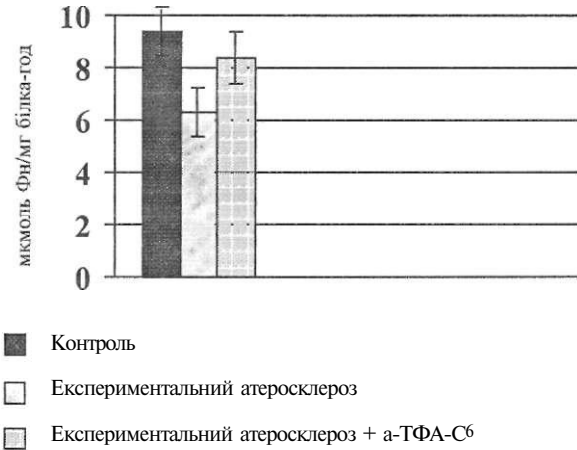


Рис. 1. Каталітична активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу та дії похідної сполуки α -токоферолу ($n = 6$, $M \pm m$, зміни достовірні, $p < 0,05$).

функціональної перебудови плазматичних мембран кардіоміоцитів, а з другого — до пригнічення активності мембранозв'язаних систем транспорту іонів.

Ці результати лягли в основу пошуку шляхів і засобів попередження та корекції описаних вище змін структурно-функціональних властивостей плазматичних мембран за умов патології та надмірної активації ПОЛ. Раніше виконана в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України серія фундаментальних досліджень довела антиокислювальну активність коротколанцюгових похідних вітаміну Е як за умов *in vitro*, так й *in vivo*, що виявлялося в пригніченні інтенсивності ПОЛ. При цьому встановлено збільшення вмісту убіхінону, активацію ферментних систем ланцюга транспорту електронів у мітохондріях печінки, збереження активності ферментів антиоксидантного захисту організму — каталази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази [6, 8, 9].

В результаті проведених досліджень було встановлено, що введення α -токоферилацетату з укороченим до С₆ бічним ланцюгом та насиченим на кінці зв'язком призводить до майже повної нормалізації ліпідної фази плазматичних мембран кардіоміоцитів. Про це свідчить достовірне зменшення вмісту холестерину, жирних кислот та збільшення рівня фосфоліпідів, що супроводжується

Таблиця 1. Ліпідний склад плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу та дії похідної сполуки α -токоферолу ($M \pm m$), $n = 6$

Умови експерименту	Показник	Холестерин мкмоль/мг білка	Фосфоліпід мкмоль Фн/мг білка	Жирні кислоти мкг/мг білка
Контроль		115,0 ± 3,9	92,0 ± 4,2	71,3 ± 5,2
Експериментальний атеросклероз		172,0* ± 16,2	75,6* ± 4,2	95,8* ± 9,4
Експериментальний атеросклероз + α -ТФА-С ₆		128,5*# ± 6,7	90,6# ± 4,6	83,0* ± 6,5

Примітки: * — різниця достовірна порівняно з контролем ($p < 0,05$); # — різниця достовірна порівняно з експериментальним атеросклерозом ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Інтенсивність процесів вільнорадикального окислення в плазматичних мембранах кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу та дії похідної сполуки α -токоферолу ($M \pm m$), $n = 6$

Умови експерименту	Показник	Дієнові кон'югати $\text{E}_{232} \cdot \text{г}^{-1}$ білка	Малоновий діальдегід мкмоль/мг білка	Спонтанна хемілюмінесценція імп./хв	Індукована хемілюмінесценція імп./хв
Контроль		36,6 ± 2,9	0,47 ± 0,05	90,0 ± 9,1	279,2 ± 41,4
Експериментальний атеросклероз		59,5* ± 5,8	0,83* ± 0,11	145,2* ± 11,2	1117,5* ± 132,3
Експериментальний атеросклероз + α -ТФА-С ₆		43,6# ± 5,6	0,50# ± 0,07	119,0*# ± 9,0	610,2*# ± 134,8

Примітки: * — різниця достовірна порівняно з контролем ($p < 0,05$); # — різниця достовірна порівняно з експериментальним атеросклерозом ($p < 0,05$).

значним зниженням молярного співвідношення холестерину і фосфоліпідів (на 37 %) у порівнянні з експериментальним атеросклерозом (табл. 1). При цьому все ж таки вміст холестерину залишається підвищеним на 12 %, жирних кислот — на 16 % порівняно з контролем, а рівень фосфоліпідів досягає такого в інтактних тварин (контроль). Молярне співвідношення холестерину і фосфоліпідів також залишається дещо збільшеним — в 1,13 раза в порівнянні з контролем (з $1,25 \pm 0,11$ до $1,42 \pm 0,13$).

Введення похідної сполуки α -токоферолу відповідно до умов експерименту призводить до суттєвого зниження інтенсивності процесів ПОЛ у фракції плазматичних мембран міокарду кролів, наближаючи показники до рівня їх у інтактних тварин (табл. 2). Так, вміст дієнових кон'югатів залишається підвищеним лише на 19% порівняно з контролем, а рівень малонового діальдегіду досягає рівня у інтактних тварин в контролі. При цьому інтенсивність спонтанної ХЛЦ залишається збіль-

шеною на 32 %, а індукованої ХЛЦ — на 118 % порівняно з контролем.

Зміни ліпідної структури плазматичних мембран кардіоміоцитів під дією похідної сполуки вітаміну Е супроводжується збереженням активності Na^+ , K^+ -АТФази, яка наближається до такої у інтактних тварин (рис. 1).

Таким чином, нами показано, що похідна сполука вітаміну Е (α -токоферилацетат з укороченим до C^6 бічним ланцюгом та насиченим на кінці зв'язком) проявляє антиоксидантні властивості за умов експериментального атеросклерозу, ефективно нормалізуючи процеси перекисного окислення ліпідів. Це разом зі встановленим нормалізуючим впливом даної сполуки на ліпідну структуру мембран та функціонування життєво важливого для кардіоміоцитів іонного насоса Na^+ , K^+ -АТФази може свідчити про її досить високу мембранопротекторну дію щодо кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу.

1. *Барабой В. А.* Спонтанная хемилюминесценция сыворотки и клеток крови в норме и при воздействии ионизирующей радиации // Лучевое поражение / Под ред. Ю. Б. Кудряшова — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987 — С. 123—131.
2. Введение в биомембранологию / Под ред. А. А. Болдырева.— М.: Изд-во МГУ, 1990.— 208 с.
3. *Даниленко М. П., Ким Э. А., Омарова Р. Д.* Действия ацетилхолина на Na^+ , K^+ -АТФазную активность разных препаратов сарколеммы миокарда // Вопросы медицинской химии.— 1983.— Т. 29.— № 1.— С. 29—33.
4. *Евстигнеева Р. П., Волков И. М., Чудинова В. В.* Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран // Биологические мембраны.— 1998.— Т. 15.— № 2.— С. 119—136.
5. *Ионов И. А.* Витамины Е и С как компоненты антиоксидантной системы эмбрионов птиц и млекопитающих // Укр. биохим. журн.— 1997.— Т. 69.— № 5—6.— С. 3—11.
6. *Коваленко В. М., Волошина О. С., Кузьменко І. В., Шяхметова Г. М., Донченко Г. В.* Корекція вільнорадикальних процесів аналогом вітаміну Е при ураженні печінки // Ліки.— 1997.— № 6.— С. 65—69.
7. *Кравцов А. В., Алексеев И. Р.* Механизмы регуляции векторных ферментов в биомембранах.— К.: Наук, думка, 1990.— 176 с.
8. *Кузьменко І. В., Даценко З. М., Донченко Г. В., Дмитренко Т. В., Кліменко К. П.* та ін. Зміни ліпідного складу та активності ферментів антиоксидантного захисту організму у мікросомах печінки шурів при дії вітаміну Е та його похідних // Наукові записки НАУКМА. Біологія та екологія.— 2000.— Т. 18.— С. 31—35.
9. *Кунца Н. И., Кузьменко И. В., Алексеев С. М., Захарова Е. И., Донченко Г. В.* Участие токоферолa и его аналогов в

процесах перекисного окислення липидов и транспорта электронов в митохондриях печени крыс in vivo // Биохимия.— 1993.—Т. 58.—Вып. 11.— С. 1709—1713.

10. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой; Под общ. ред. Ю. А. Зозули,— К.: Наук, думка, 1997.— 420 с.
11. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977.— С. 63—64.
12. *Стальная И. Д., Гаршвили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977.— С. 66—68.
13. *Ademoglu E., Gokkusu C, Palanduz S.* Vitamin E and ATPases: protection of ATPase activities by vitamin E supplementation in various tissues of hypercholesterolemic rats // Int. J. Vitam. Nutr. Res.— 2000.— V. 70.— № 1,— P. 3—7.
14. *Folch J. M., Lees G. H., Sloane-Stanley A.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem.— 1957.— V. 226.— № 1.— P. 497—509.
15. *Louis P. J., Sulakhe P. V.* Isolation of sarcolemma membranes from cardiac muscle // Int. J. Biochem.— 1976.— V. 77.— P. 547—558.
16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Parr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— V. 193.— P. 265—276.
17. *Rathbun W. B., Betlach M. V.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // Analytical Biochem.— 1969.— V. 28.— № 1—3.— P. 436—446.

Mkhitaryan L. S., Kuchmenko O. B., Donchenko G. V., Kuzmenko I. V.

THE INFLUENCE OF VITAMIN E DERIVATIVE
ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE
OF CARDIOMYOCYTES PLASMA MEMBRANES UNDER
THE EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

The results of research of influence of vitamin E derivative with the shortened side chain to C⁶ on the structural and functional state of cardiomyocytes plasma membranes under the experimental atherosclerosis are given. There are arranged the antioxidation properties, normalization influence on the lipid structure and on the functioning of Na⁺, K⁺ ATPase of vitamin E derivative under the experimental atherosclerosis. All of these can witness of enough high membranes protective action of vitamin E derivative with C⁶ in the side chain on the cardiomyocytes under the experimental atherosclerosis.