

УДК 577.115.3: 591

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМЫ И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Гидулянова К.В., Коношенко С.В.

При многих заболеваниях усиливаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1 – 4]. Значительное повышение активности свободнорадикального окисления может привести к нарушению функции клеток и как следствие к развитию патологии. Мишенью реакций ПОЛ становятся, прежде всего, клеточные мембраны, содержащие большое количество ненасыщенных жирных кислот, характеризующихся биоэффекторными свойствами, в частности, мембрана эритроцитов [1 – 3, 5, 6]. Жирные кислоты, как в свободном состоянии, так и в комплексе с фосфолипидами играют важную роль в жизнедеятельности клеток и организмов. Эти компоненты мембран принимают участие в регуляции многих процессов как в норме, так и при патологическом состоянии организма.

Мембрана эритроцитов является наиболее удобной моделью для изучения мембранопатологических процессов при заболеваниях внутренних органов. Это обусловлено как простотой организации зрелых клеток красной крови, так и доступностью их для проведения лабораторных исследований [7].

Однако до сих пор остается недостаточно глубоко изученным вопрос о взаимосвязи структурных изменений, происходящих в эритроцитарной мембране и плазме при интенсификации окислительных процессов, в условиях окислительного стресса при патологических процессах, в частности при хроническом гломерулонефрите.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение жирнокислотного состава плазмы и мембран эритроцитов у больных хроническим гломерулонефритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служила кровь 30 больных хроническим гломерулонефритом в стадии ремиссии в возрасте 30-45 лет. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей – доноров. Эритроцитарные мембраны (ЭМ) выделяли по методу Сербиновой Т.А. [8]. Экстракцию липидов из эритроцитарных мембран и плазмы осуществляли по методу Folch I. et al. [9]. Метилирование выделившихся жирных кислот проводили методом переэтерификации 14 % раствором BCl_3 в безводном метаноле [10]. Газохроматографический анализ метиловых эфиров ЖК проводили на

хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973 (США). Использовали кварцевую колонку INNOWAX (Agilent Technologies, США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25мм

Газ-носитель – гелий. Расход газа-носителя – 1мл/мин. Температура детектора 100-230°C, температура испарителя - 270°C. Идентификацию компонентов проводили методом хромато-масс-спектрометрии (база данных NIST02).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении жирнокислотного состава плазмы и мембран эритроцитов больных хроническим гломерулонефритом были получены данные, представленные в таблице 1.

Анализ жирнокислотного состава мембран эритроцитов показал, что у больных хроническим гломерулонефритом были выявлены сдвиги в жирнокислотном обмене – достоверное повышение содержания насыщенных жирных кислот с 26,2% у доноров до 29,2% у больных (в среднем на 12%). Данное увеличение насыщенности мембраны происходит за счет повышения уровня содержания пальмитиновой и стеариновой кислот на 21% и 46% соответственно.

Уровень лауриновой (12:0), миристиновой (14:0) и пентадекановой кислот (15:0) был достоверно ниже относительно содержания данных кислот в группе доноров. Так, уровень содержания лауриновой кислоты был на 72% ниже, чем в контрольной группе, уровень миристиновой – на 60% и уровень пентадекановой – на 53% ниже соответственно.

В целом повышение уровня содержания насыщенных жирных кислот в мембране эритроцитов может быть проявлением компенсаторных реакций, направленных на поддержания мембран в жидкокристаллическом состоянии, что отмечается в ряде источников [6, 11, 12].

В группе больных хроническим гломерулонефритом коэффициент отношения насыщенных жирных кислот к ненасыщенным был на 21,5% выше, чем в контроле.

Сравнение уровня содержания ненасыщенных жирных кислот показало, что уровень их содержания в мембранах эритроцитов больных составляет 40,3%, что на 8% ниже уровня контрольной группы. При изучении относительного содержания отдельных ненасыщенных жирных кислот были обнаружены статистически достоверные различия между группой больных и контрольной группой ($p < 0,05$).

Уровень моноеновых жирных кислот находится на 19% ниже уровня контрольной группы и составляет 17,7%. Это связано со снижением содержания таких кислот как миристолеиновая (14:1) - на 77% и пальмитолеиновая (16:1) - в среднем на 78% относительно уровня содержания в контрольной группе.

По общему содержанию полиненасыщенных жирных кислот группа больных и здоровых людей достоверно не отличались, но различия в содержании жирных кислот представителей семейств $\omega 3$, $\omega 6$ и $\omega 9$ были статистически достоверны.

Содержание жирных кислот семейства $\omega 3$ была на 41,6% ниже, чем в контрольной группе. Отмечено достоверное снижение всех представителей данного семейства. Процент снижения увеличивается в ряду 18:3 → 20:5 → 22:5 → 22:6. Так, уровень содержания α -линоленовой кислоты (18:3 $_{\omega 3}$) снижен на 25%

относительно контроля, эйкозапентаеновой (20:5_{ω3}) – на 29%, докозапентаеновой (22:5_{ω3}) – на 37% и докозагексаеновой (22:6_{ω3}) – на 51% соответственно.

Таблица 1.

Жирнокислотный состав липидов плазмы и мембран эритроцитов больных хроническим гломерулонефритом ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Жирные кислоты	Мембрана, %		Плазма, %	
	Доноры	Больные	Доноры	Больные
лауриновая 12:0	0,48±0,015	0,13±0,004*	0,19±0,006	0,24±0,009*
миристиновая 14:0	2,37±0,056	0,95±0,010*	1,71±0,037	2,26±0,013*
миристолеиновая 14:1	1,3±0,045	0,30±0,012*	0,74±0,023	0,50±0,013*
пентадекановая 15:0	2,29±0,046	1,08±0,061*	1,65±0,022	2,28±0,011*
пальмитиновая 16:0	14,84±0,220	18,00±0,411*	22,33±0,286	25,06±0,200*
пальмитоолеиновая 16:1 _{7i}	2,17±0,069	0,46±0,008*	0,32±0,006	0,23±0,008*
пальмитоолеиновая 16:1 _{9i}	7,8±0,086	1,70±0,035*	4,17±0,023	2,97±0,082*
стеариновая 18:0	6,20±0,069	9,05±0,190*	7,81±0,085	8,36±0,015*
олеиновая 18:1 _{9i} (ω9)	8,64±0,12	12,45±0,145*	14,80±0,172	19,69±0,101*
олеиновая 18:1 _{7i} (ω9)	0,96±0,036	1,61±0,035*	1,62±0,016	2,16±0,032*
линолевая 18:2 (ω6)	9,23±0,076	8,48±0,089*	20,42±0,194	14,43±0,089*
γ-линоленовая 18:3 (ω6)	3,21±0,124	2,65±0,117*	4,65±0,133	3,86±0,013*
α-линоленовая 18:3 (ω3)	1,15±0,020	0,86±0,013*	1,35±0,032	4,05±0,046*
эйкозеновая 20:1	0,26±0,014	0,37±0,010*	0,27±0,008	0,35±0,012*
эйкозодиеновая 20:2	0,21±0,017	0,18±0,005	0,31±0,010	0,44±0,006*
эйкозатриеновая 20:3 (ω9)	1,2±0,031	1,50±0,029*	2,05±0,059	1,57±0,011*
арахидоновая 20:4 (ω6)	2,28±0,045	6,39±0,051*	5,18±0,025	4,50±0,018*
эйкозапентаеновая 20:5 (ω3)	0,55±0,011	0,39±0,014*	0,61±0,004	0,39±0,011*
докозеновая 22:1 (ω9)	0,72±0,015	0,79±0,020*	0,87±0,011	0,73±0,010*
докозапентаеновая 22:5 (ω3)	0,94±0,018	0,59±0,012*	1,09±0,031	0,50±0,015*
докозагексаеновая 22:6 (ω3)	3,27±0,077	1,61±0,006*	4,53±0,010	1,95±0,016*
Насыщенные	26,18±0,406	29,21±0,676*	33,69±0,436	38,2±0,248*
Ненасыщенные	43,89±0,804	40,33±0,601*	62,98±0,757	58,32±0,483*
Моноеновые	21,85±0,385	17,68±0,265*	22,79±0,259	26,63±0,258*
Полиненасыщенные	22,04±0,419	22,65±0,336	40,19±0,498	31,69±0,225*
Σω 3	5,91±0,126	3,45±0,045*	7,58±0,077	6,89±0,088*
Σω 6	14,72±0,245	17,52±0,257*	30,25±0,352	22,79±0,120*
Σω 9	11,52±0,202	16,35±0,229*	19,34±0,258	24,15±0,154*
Σω6/Σω3	2,49	5,08	3,99	3,31
Коэффициент насыщенности	0,60	0,72	0,54	0,66
Углеводороды	29,93±0,189	30,45±0,304	3,33±0,077	3,48±0,138

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (доноров) (p<0,05).

Эту динамику изменений можно объяснить, во-первых, тем, что при различных патологических состояниях интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов и активные формы кислорода, образующиеся в ходе свободнорадикальных реакций, атакуя мембрану, разрушают ненасыщенные жирные кислоты с наибольшим содержанием двойных связей, тем самым, способствуя элиминации их из мембран в описанном выше направлении. Помимо этого, такие кислоты, как 22:5 и 22:6 являются предшественниками для синтеза биологически активных соединений, с чем так же может быть связано их более выраженное снижение [6, 12, 14].

Однако наряду со снижением уровня содержания жирных кислот представителей семейства $\omega 3$ наблюдается увеличение в содержании жирных кислот семейств $\omega 6$ и $\omega 9$. Содержание жирных кислот семейства $\omega 6$ было на 19% выше относительно контроля. Данное повышение происходит за счет арахидоновой кислоты (20:4 _{$\omega 6$}), уровень которой превышает показатель контроля в 2,8 раза. Уровень содержания других представителей данного семейства был ниже относительно контроля. Так, содержание линолевой кислоты (18:2 _{$\omega 6$}) на 8% ниже показателя доноров, а содержание γ -линоленовой (18:3 _{$\omega 6$}) кислоты - на 17%.

Возможно, что в условиях патологии линолевая кислота (18:2 _{$\omega 6$}) более активно используется для синтеза арахидоновой кислоты, которая может включаться в процессы ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов, интенсивность которого при патологических процессах повышается [6].

При этом отношение $\sum \omega 6 / \sum \omega 3$ в мембранах больных превышает уровень контрольной группы в 2 раза и составляет 5,08 против нормы 2,94.

Наблюдается увеличение в содержании жирных кислот семейства $\omega 9$ (в целом на 42% относительно уровня в контроле). Отмечается статистически значимое повышение содержания олеиновой кислоты (18:1 _{$\omega 9$}), эйкозатриеновой (20:3 _{$\omega 9$}) и докозеновой (22:1 _{$\omega 9$}) кислот ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения зафиксированы в содержании олеината (в среднем 56% от уровня контрольной группы). Уровень эйкозатриеновой и докозеновой кислот повышается на 25% и 9% соответственно.

Повышение уровня содержания жирных кислот семейства $\omega 9$ может быть обусловлено тем, что в условиях патологии в связи с развивающимся окислительным стрессом, основной мишенью для действия активных форм кислорода являются жирные кислоты семейств $\omega 3$ и $\omega 6$, содержащие наибольшее количество двойных связей. Помимо этого возможен более активный синтез кислот семейства $\omega 9$ в связи с недостаточностью содержания кислот семейств $\omega 3$ и $\omega 6$, в частности таких их представителей как линолевая кислота (семейство $\omega 3$) и α -линоленовая кислота (семейство $\omega 6$) [5]. Об этом свидетельствует не только рост содержания кислот семейства $\omega 9$, но так же их предшественника – пальмитиновой кислоты (16:0).

При исследовании жирнокислотного состава липидов плазмы крови при хроническом гломерулонефрите получены данные, представленные в таблице 1. Из таблицы следует, что у больных хроническим гломерулонефритом достоверно увеличено содержание насыщенных жирных кислот – на 13% по сравнению с данными контрольной группы.

В целом подобная картина изменения в содержании насыщенных жирных кислот отмечена и для мембраны эритроцитов. Данные изменения проявляются в плазме у больных гипертонической болезнью [13], вирусным гепатитом [14], хроническим панкреатитом [15], при подпеченочной желтухе [16], при раке желудка [17] и других патологических состояниях.

Данное повышение характерно для всех жирных кислот этой группы. Так, уровень содержания лауриновой кислоты (12:0) превышает данный показатель у доноров на 26% и составляет $0,24 \pm 0,009\%$, концентрация миристиновой (14:0) кислоты увеличена на 32% и составляет $2,26 \pm 0,013\%$, пентадекановой кислоты (15:0) – на 38%. Увеличение пальмитиновой (16:0) и стеариновой кислот (18:0) менее выражено и составляет 12% и 7% соответственно.

Наряду с увеличением уровня содержания насыщенных жирных кислот происходит достоверное снижение уровня содержания ненасыщенных жирных кислот, в среднем на 7%. Данное снижение происходит за счет снижения содержания полиненасыщенных жирных кислот (на 21% относительно контроля), что так же характерно для ряда патологических состояний [13-19]. В частности, отмечено снижение уровня содержания жирных кислот представителей семейств $\omega 3$ и $\omega 6$.

Жирные кислоты $\omega 3$ семейства снижаются на 9% по сравнению с данным показателем контрольной группы, жирные кислоты $\omega 6$ семейства снижены на 24,7% соответственно. Снижение содержания жирных кислот семейства $\omega 3$ происходит в основном за счет эйкозапентаеновой (20:5 $_{\omega 3}$) - на 36%, докозапентаеновой (22:5 $_{\omega 3}$) - на 54% и докозагексаеновой (22:6 $_{\omega 3}$) - на 57%, кислот соответственно [20]. Однако уровень α -линоленовой кислоты 18:3 превышает данный показатель в норме в 2 раза и составляет $3,86 \pm 0,013\%$. Это можно объяснить тем, что данная кислота является предшественником для синтеза последующих кислот данного семейства, которые в свою очередь используются для синтеза биологически активных соединений. Поскольку уровень содержания этих кислот снижен, α -линоленовая кислота синтезируется более активно.

Семейство $\omega 6$ характеризуется тем, что все кислоты, входящие в его состав, снижаются в плазме больных хроническим гломерулонефритом. Содержание линолевой кислоты (18:2 $_{\omega 6}$) снижается на 29%, γ -линоленовой (18:3 $_{\omega 6}$) – на 17% и арахидоновой (20:4 $_{\omega 6}$) – на 13% соответственно относительно уровня содержания данных кислот в контрольной группе. Отношение $\sum \omega 6 / \sum \omega 3$ у больных составило 3,31, что ниже показателя контроля на 2,4%.

Необходимо отметить, что в плазме больных происходит достоверное увеличение содержания жирных кислот семейства $\omega 9$ – на 24,8%. Это происходит за счет увеличения уровня содержания олеиновой кислоты (18:1 $_{\omega 9}$) на 33% относительно контроля.

Для эйкозатриеновой (20:3 $_{\omega 9}$) и докозеновой (22:1 $_{\omega 9}$) кислот характерно снижение уровня их содержания. Так, уровень эйкозатриеновой кислоты снижен на 23%, а уровень докозеновой – на 16%.

Анализируя изменения, происходящие в мембранах эритроцитов и плазме крови, можно отметить повышение коэффициента насыщенности как в мембранах

эритроцитов (на 20% относительно контрольной группы), так и в плазме крови (на 22% соответственно). Это может являться показателем того, что в условиях патологии в мембране эритроцитов осуществляются перестройки, направленные на поддержание структуры и вязкости мембраны в условиях недостатка ненасыщенных жирных кислот за счет повышения уровня насыщенных жирных кислот, а именно за счет жирных кислот с 16 и 18 углеродными атомами. Возможно, увеличение содержания длинноцепочечных насыщенных жирных кислот приводит к стабилизации мембраны, атакуемой активными формами кислорода. В плазме происходит более значительное увеличение короткоцепочечных жирных кислот, которые идут на синтез длинноцепочечных, активно используемых мембраной.

Более выраженное снижение ненасыщенных жирных кислот отмечено для плазмы крови. Очевидно, что жирные кислоты плазмы крови в большей степени атакуются активными формами кислорода и вместе с этим плазма является источником насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, которые необходимы мембране для нормального функционирования и могут не только использоваться для поддержания структуры мембраны, но так же в качестве предшественников для синтеза биологически активных соединений.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования длинноцепочечных жирных кислот плазмы крови для поддержания структуры и вязкости мембраны эритроцитов.

Отмеченные изменения в жирнокислотном составе мембран эритроцитов и плазмы крови при хроническом гломерулонефрите свидетельствует о глубоких нарушениях липидного обмена при развитии данного заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В плазме крови и мембранах эритроцитов больных хроническим гломерулонефритом прослеживаются изменения в жирнокислотном составе. Отмечается снижение уровня содержания ненасыщенных жирных кислот: в мембранах - за счет моноеновых жирных кислот, в плазме – в большей степени за счет полиненасыщенных жирных кислот, в частности, жирных кислот семейства $\omega 3$. В плазме отмечено так же снижение жирных кислот семейства $\omega 6$.

2. У больных хроническим гломерулонефритом происходит сдвиг в сторону увеличения насыщенности мембраны, о чем свидетельствует коэффициент насыщенности. В мембранах увеличение происходит за счет длинноцепочечных насыщенных жирных кислот, в плазме – за счет короткоцепочечных.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – С. 39-40.
2. Зенков Н.А., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, вып. 3. – С. 286-296.
3. Кармен Н.Б. Окислительная модификация мембран эритроцитов в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы и ее коррекция клонидином // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2003. – Т.136, № 10.–С. 410-414.

4. Осочук С.С. Сравнительная характеристика изменений спектра жирных кислот липопротеинов высокой плотности больных аппендицитом мужчин разного возраста // Клинич. лаб. диагностика. – 2003. – № 8. – С. 22-35.
5. Титов В.Н. Транспорт липопротеидами насыщенных и полиеновых жирных кислот // Успехи соврем. биол. – 1997. – Т.117, вып.2. – С. 240-253.
6. Хышиктуев Б.С., Хышиктуева Н.А., Иванов В.Н. и др. Жирно-кислотный состав липидов плазмы крови и эритроцитов у больных раком легкого // Вопр. мед. химии.– 1994. – Т.40.– Вып.5. – С. 48-50.
7. Журавлева Т.Д., Долгов В.В., Суплютов С.Н. и др. Особенности липидного состава мембран эритроцитов у здоровых людей разного возраста // Клинич. лаб. диагностика. – 2003. – №5. – С. 50-52.
8. Сербинова Т.А. Получение свободной от гемоглобина мембраны эритроцитов и изменение ее структуры при повреждающих воздействиях и хранении консервируемой крови: Автореф. дисс... канд. мед. наук. – М., 1980.– 19 с.
9. Folch J., Less V., Slean-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem.– 1957. – V. 226, № 2.– P. 494-509.
10. K.Blau, J.Halket. Handbook of Derivatives for Chromatography (2nd ed.). – John Wiley & Sons, NY, 1993. – P.600-608.
11. Томчук В.А., Мельничук Д.О. Природа та склад жирних кислот ліпідів крові новонароджених телят при диспепсії // Укр. біохім. журнал. – 2003. – Т. 75. №1. – С. 72-77.
12. Друккер Н.А., Погорелова Т.Н. Жирно-кислотный состав фосфолипидов мембран плаценты у женщин с гипофункцией яичников в анамнезе // Вопр. мед. химии.– 1996. – Т.42. – Вып. 1. – С. 54-58.
13. Говорин А.В., Ларева Н.В., Хышыктуев Б.С., Филев А.П. // Российский кардиологический журнал. – 2003. – №3. – С. 19-24.
14. Левина Л.Д., Зуева В.В., Аствацатурьян А.Т. Жирные кислоты в крови больных острым вирусным гепатитом // Лаб. дело. – №11. – 1981. – С. 649-652.
15. Мансурова И.Д., Султанова У.К. Определение содержания высших жирных кислот в сыворотке крови здоровых и больных хроническим панкреатитом методом газовой хроматографии // Лаб.дело.– 1985. – №9. – С. 524-527.
16. Левина Л.Д., Зуева В.В. Высшие жирные кислоты крови при вирусном гепатите В и подпеченочной желтухе опухолевого генеза // Клин. медицина.– 1985. – №5. – С. 106-108.
17. Геворкян И.Ю., Аббасов Ф.С., Панахов Д.М. Жирно-кислотный спектр плазмы крови у больных раком желудка в отдаленном послеоперационном периоде // Эксп. и клинич. медицина.– 1990. – Т.30, № 1. – С. 7-10.
18. Брюзгина Т.С., Амосова Е.Н., Лыховский О.И., Вретик Г.М., Голод А.Г., Рева С.Н. Жирно-кислотный состав липидов в липопротеинах сыворотки крови при хронических заболеваниях печени // Клиническая лаб. диагн. – 1999. – № 7. – С. 5-6.
19. Кузин М.И., Шимкевич Л.Л., Истратов В.Г., Амирасланов Ю.А. Диагностическая роль определения спектра жирных кислот плазмы крови у больных с гнойной хирургической инфекцией // Вестник хирургии им. И.И.Грекова. – 1984. – Т.132, №5. – С. 3-7.
20. Блюдзин Ю.А., Липатова Т.А., Опарина Т.И. Жирнокислотный состав отдельных фракций липидов опухолевой ткани при раке молочной железы // Вопр. мед. химии.–1994. – Вып.5. – С. 50-53.

Поступила в редакцию 20.10.2006 г.