

УДК 577.115.3: 591

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЖИРНО-КИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Гидулянова К.В., Коношенко С.В.

Известно, что в клетках большинства органов и тканей человека осуществляются процессы свободнорадикального окисления липидов. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) выполняет в организме определенные физиологические функции – регулирует процессы обновления биологических мембран, оказывает влияние на проницаемость клеточных мембран. Значительное повышение активности свободнорадикального окисления липидов может привести к нарушению функции клеток и, как следствие, к развитию патологии. Мишенью реакций перекисного окисления становятся, прежде всего, клеточные мембраны, содержащие большое количество ненасыщенных жирных кислот, в частности, мембрана эритроцитов [1 – 8].

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 [9, 10].

Вместе с этим, несмотря на всю широту исследований эритроцитов, до сих пор остается недостаточно глубоко изученным вопрос о структурных изменениях, происходящих в эритроцитарной мембране при интенсификации окислительных процессов, в условиях окислительного стресса.

Исходя из этого, целью данного исследования явилось изучение влияния окислительного стресса на жирно-кислотный состав мембран эритроцитов, используя систему Фентона (Fe^{2+} , H_2O_2) в модельных опытах *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служила кровь 30 практически здоровых людей – доноров. Эритроцитарные мембраны (ЭМ) выделяли по методу Сербиновой Т.А. [11]. Экстракцию липидов из эритроцитарных мембран осуществляли по методу Folch I. et al. [12]. Жирные кислоты метилировали, используя 14 % тетрафлуорид бора в метаноле [13]. Газохроматографический анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе «Dani 1000» (Италия) с пламенно-ионизационным детектором. Использовали капиллярную колонку, наполненную фазой HP 23, длина колонки 30м. Газ-носитель – азот. Скорость газа-носителя -

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЖИРНО-КИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

40мл/мин. Температура детектора 60-200°C, температура испарителя - 180°C. Идентификацию жирных кислот осуществляли по стандартным препаратам метиловых эфиров жирных кислот фирмы «Merck» (Германия). Состав жирных кислот рассчитывали методом внутреннего нормирования. Инициацию окислительных процессов в эритроцитах осуществляли, используя среду Фентона (3 мМ перекись водорода, 10мМ сернокислое железо), инкубируя эритроциты в этих условиях в течение 1, 2 и 24 часов [14]. Среда Фентона является источником активных форм кислорода, образование которых имеет циклический характер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как нами было показано ранее, при изучении процессов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов доноров в условиях инкубации эритроцитарных клеток в среде Фентона в течение 1, 2 и 24 часов происходят определенные изменения, сопровождающиеся закономерным снижением в составе их мембран уровня общих липидов и повышением содержания гидроперекисей и вторичных продуктов перекисного окисления липидов [15, 16]. Очевидно, что наблюдаемые изменения в процессах липопероксидации, инициируемых активными формами кислорода, когда многие клеточные системы функционируют практически в условиях окислительного стресса, могут приводить к нарушениям структуры мембран, в частности, к изменению жирно-кислотного состава мембран эритроцитов.

Так, при инициации окислительных процессов *in vitro* (среда Фентона) в мембранах эритроцитов суммарное содержание насыщенных жирных кислот составило от 23,7 отн.% до 24,54 отн.% (табл 1).

Таблица 1.
Показатели основных жирных кислот мембран эритроцитов в условиях инициации окислительного стресса *in vitro* (M±m, отн %)

Жирные кислоты	Доноры	1 час инициации	2 часа инициации	24 часа инициации
Насыщенные	24,54±1,06	24,39±0,33	23,93±0,32	23,70±0,86
Ненасыщенные	75,40±4,77	71,05±1,13	59,95±1,06*	49,38±1,61*
Моноеновые	25,39±1,42	23,11±0,48	19,76±0,41*	15,43±0,56*
Полиненасыщенные	50,01±3,35	47,94±0,66	40,19±0,65*	33,95±1,02*
∑ω 3	4,03±0,44	3,37 ±0,10	1,77 ±0,12*	1,35 ±0,12 *
∑ω 6	40,46±2,31	39,27 ±0,49	33,23 ±0,42*	27,60 ±0,81*
∑ω 9	21,46±1,26	19,84±0,37	17,78±0,38*	14,87±0,35 *
∑ω 6 / ∑ω 3	10,04	11,65	18,77	20,45
Коэффициент насыщенности	0,33	0,34	0,39	0,48

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

В этих условиях происходит снижение содержания всех изученных насыщенных жирных кислот мембран эритроцитов (14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0 и 24:0) и даже несмотря на кажущееся увеличение уровня содержания лауриновой кислоты 12:0 (в относительных процентах), при пересчете ее содержания в абсолютные проценты мы наблюдаем снижение уровня ее содержания (табл.2).

Уровень содержания лауриновой кислоты снижался на 57 % при 1 часовой инкубации эритроцитов в среде Фентона, на 65 % - при 2 часовой и на 74% при 24 часовой инкубации. Нами отмечена тесная отрицательная корреляция между уровнем содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов в мембране эритроцитов в динамике инкубации эритроцитов в среде Фентона и уровнем содержания насыщенных жирных кислот ($r = -0,88$). Так же прослеживается тесная корреляция между уровнем гидроперекисей и уровнем содержания насыщенных жирных кислот в той же динамике ($r = -0,86$). Из изученных нами насыщенных жирных кислот достоверные изменения характерны для лауриновой, стеариновой и арахидиновой жирных кислот при 2 часовой инкубации ($p < 0,05$), для лауриновой и арахидиновой - при 24 часовой ($p < 0,05$).

Однако в целом изменения уровня содержания насыщенных жирных кислот носят недостоверный характер и это может быть связано с тем, что в условиях окислительного стресса *in vitro* насыщенные жирные кислоты, не имеющие в своем составе двойных связей, не являются основной мишенью для атаки окислительных радикалов и остаются практически неповрежденными.

Таблица 2.
Показатели основных жирных кислот мембран эритроцитов в условиях инициации окислительного стресса *in vitro* ($M \pm m$, абс%)

Жирные кислоты	Доноры	1 час инициации	2 часа инициации	24 часа инициации
Насыщенные	0,31±0,01	0,12 ±0,003*	0,066 ±0,002*	0,043±0,002*
Ненасыщенные	0,95±0,02	0,31 ±0,007*	0,167 ±0,002*	0,09±0,003*
Моноеновые	0,32±0,02	0,10 ±0,003*	0,055 ±0,001*	0,029±0,001*
Полиненасыщенные	0,63±0,005	0,21 ±0,004*	0,112 ±0,001*	0,062±0,002*
$\sum \omega 3$	0,05±0,006	0,02 ±0,001*	0,005 ±0,0003*	0,002±0,0002*
$\sum \omega 6$	0,51±0,03	0,17 ±0,002*	0,093 ±0,0007*	0,05±0,001*
$\sum \omega 9$	0,27±0,02	0,09 ±0,002*	0,05 ±0,0009*	0,027±0,001*
$\sum \omega 6 / \sum \omega 3$	9,79	11,53	17,17	20,96
Коэффициент насыщенности	0,33	0,34	0,40	0,47

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

При этом отмечается существенное снижение уровня содержания ненасыщенных жирных кислот. Уровень содержания ненасыщенных жирных кислот колеблется в пределах от 49,38 % до 75,40 %. Отмечено снижение уровня содержания как моноеновых, так и полиненасыщенных жирных кислот (табл.1).

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЖИРНО-КИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

Уровень содержания моноеновых жирных кислот снижается на 9 % при 1 часовой инкубации, на 22 % при 2 часовой и на 39 % при 24 инкубации эритроцитов в среде Фентона. Данные изменения проявляются за счет наиболее выраженного снижения таких жирных кислот, как эйкозеновая 20:1 (на 12 %, 32 % и 49 % при 1, 2 и 24 часовой инкубации соответственно) и докозеновая 22:1 (на 17 %, 40 % и 46 % при 1, 2 и 24 часовой инкубации), в меньшей степени снижается олеиновая кислота 18:1 (на 8 %, 20 % и 36 % при 1, 2 и 24 часовой инкубации). Данные изменения при 2 и 24 часовой инкубации эритроцитов в среде Фентона носят достоверный характер ($p < 0,05$) (табл.1).

Наряду со снижением практически всех моноеновых жирных кислот, отмечено повышение уровня содержания миристолеиновой кислоты (на 1,5 % при 1 часовой инкубации, на 6 % и на 10 % при 2 и 24 инкубации). Данные изменения в уровне ее содержания прослеживаются в относительных процентах. Однако при перерасчете в абсолютные проценты данное повышение отмечено не было (табл.2). Уровень содержания миристолеиновой кислоты снижается в динамике инкубации в среде Фентона в абс.% на 50 %, 75 % и 83 % при 1, 2 и 24 часа инкубации. Отмечена тесная отрицательная корреляция между уровнем вторичных продуктов перекисного окисления липидов и уровнем содержания моноеновых жирных кислот ($r = -0,94$).

Наблюдается так же снижение уровня содержания полиненасыщенных жирных кислот (табл.1). При 1 часовой инкубации происходит снижение уровня содержания полиненасыщенных жирных кислот на 4 % относительно контрольной группы, при 2 и 24 часовой инкубации данный показатель снижается на 20 % и 32 % соответственно. Причем, данное снижение в наибольшей степени обусловлено снижением уровня содержания жирных кислот семейства $\omega 3$. По данным литературы, энергия разрыва С-Н связи в молекулах насыщенных жирных кислот (типа палимитиновой или стеариновой) составляет около 93 ккал/моль. Энергия разрыва такой же связи у углеродного атома с двойной связью несколько меньше: 89 ккал/моль. Наименьшую энергию (77 ккал/моль) нужно затратить, чтобы оторвать Н-атом от углерода, находящегося в α -положении по отношению к двойной связи. Неудивительно поэтому, что олеиновая кислота окисляется в 11 раз быстрее стеариновой кислоты [1].

Представители семейства $\omega 3$ содержат в составе молекул наибольшее количество двойных связей (относительно представителей других семейств), в частности, α -линоленовая кислота содержит 3 двойных связи, эйкозапентаеновая и докозапентаеновая – по 5, а докозагексаеновая – 6. Этим и можно объяснить отмеченное выше увеличение реакционной способности (в отношении перекисного окисления) жирных кислот с увеличением числа двойных связей [1]. Тем самым наиболее выраженным снижением уровня содержания жирных кислот $\omega 3$ семейства (см. ниже).

Данные изменения обусловлены наибольшим снижением α -линоленовой кислоты 18:3 – на 22 % при 1 часовой инкубации, на 74 % и 83 % при 2 и 24 часовой инкубации в среде Фентона, несмотря на то, что в составе ее молекулы количество двойных связей меньше, чем у других представителей данного семейства. Причиной этому может быть то, что на общую скорость окисления ненасыщенных жирных

кислот, входящих в состав мембран клеток, могут влиять различные факторы. Определяющую роль в данном процессе может играть структурная организация липидов мембран – чем плотнее упаковка ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран, тем меньше доступ кислорода или активных форм кислорода и ниже скорость зарождения радикалов. Любые воздействия, нарушающие упаковку ненасыщенных жирных кислот, ускоряют окисление.

Для структурированных липидов, по данным Ю.П.Козлова и др. [2], скорость перекисного окисления может и не зависеть от степени ненасыщенности жирных кислот [2]. Поэтому, можно предположить, что скорость окисления жирных кислот будет определяться скоростью диффузии активных форм кислорода к ним и концентрацией жирных кислот. На начальном этапе окисления мембраны под воздействием активных форм кислорода, возможно будет происходить окисление в большей степени α -линоленовой кислоты, поскольку уровень содержания α -линоленовой кислоты значительно превышает уровень содержания других изученных жирных кислот данного семейства (в среднем в 4,6 раза при 1 часовой инкубации, в 1,9 раза и 1,6 раза при 2 и 24 часовой инкубации эритроцитов соответственно).

В дальнейшем, когда в результате воздействия активных форм кислорода будет нарушена упаковка ненасыщенных жирных кислот, скорость окисления липидов будет существенно зависеть от степени их ненасыщенности, так как скорость реакции продолжения цепи зависит от количества двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах. Поэтому изменение состава фосфолипидов мембран может существенно влиять на общую скорость перекисного окисления липидов [2].

В меньшей степени проявляется снижение содержания у других представителей семейства, таких как эйкозапентаеновая, докозапентаеновая и докозагексаеновая кислота – в среднем на 9 %, 30 % и 44 % при 1, 2 и 24 инкубации. Нами отмечена тесная отрицательная корреляция между уровнем содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов в мембране эритроцитов в динамике инкубации эритроцитов в среде Фентона и уровнем содержания ненасыщенных жирных кислот $\omega 3$ семейства ($r = -0,81$). Так же прослеживается тесная корреляция между уровнем гидроперекисей и уровнем содержания ненасыщенных жирных кислот семейства $\omega 3$ ($r = -0,80$). Из ненасыщенных жирных кислот $\omega 3$ семейства достоверные изменения характерны при 2 и 24 часовой инкубации ($p < 0,05$), при 1 часовой инкубации данных изменений не выявлено.

Уровень содержания жирных кислот представителей семейств $\omega 6$ и $\omega 9$ так же снижался, но менее интенсивно (табл.1). Так уровень содержания жирных кислот представителей семейства $\omega 6$ снижается на 3 %, 18 % и 32 % при 1, 2 и 24 часовой инкубации, соответственно, относительно данного показателя контрольной группы. Наиболее выраженное снижение характерно для γ -линоленовой кислоты 18:3 – на 37 %, 63 % и 73 % в условиях 1, 2 и 24 инкубации. Менее выраженные изменения отмечены в уровне содержания арахидоновой и линолевой кислот. Так, уровень содержания линолевой кислоты снижался на 4,5 % при 1 часовой инкубации, на 6,3 % и 27 % при 2 и 24 часовой инкубации. Наблюдается достоверное снижение уровня содержания арахидоновой кислоты – на 2 %, 20,6 % и 32,3 % в условиях инкубации эритроцитов в течение 1, 2 и 24 часов относительно данных контрольной

группы. Снижение уровня содержания линолевой и арахидоновой кислот свидетельствует об активизации процессов перекисного окисления липидов [17]. Так же прослеживается тесная отрицательная корреляция между уровнем гидроперекисей и уровнем содержания ненасыщенных жирных кислот $\omega 6$ семейства ($r = -0,93$). Корреляция между уровнем вторичных продуктов перекисного окисления липидов и уровнем содержания ненасыщенных жирных кислот $\omega 6$ семейства составляет $-0,94$.

Уровень содержания жирных кислот представителей семейства $\omega 9$ так же снижался. В частности, уровень содержания докозеновой кислоты снижался на 17 %, 40 % и 47 % при инкубации эритроцитов в течение 1, 2 и 24 часов. Уровень содержания олеиновой кислоты 18:1 снижался на 8 %, 20 % и 36 % соответственно относительно данного показателя контрольной группы. Гораздо менее выраженные изменения характерны для эйкозатриеновой кислоты. Ее уровень снижался на 4 % при 1 часовой инкубации, на 6 % и 9,4 % при 2 и 24 часовой инкубации. Возможно, это связано с тем, что активные формы кислорода, атакуя единственную двойную связь в молекулах докозеновой и олеиновой кислот, приводят к более быстрому распаду молекулы, чем эйкозатриеновой кислоты, которая в составе своей молекулы имеет 3 двойные связи. Нами установлена хорошо выраженная отрицательная корреляция между уровнем содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов и уровнем содержания жирных кислот семейства $\omega 9$ ($r = -0,94$). Так же отмечена тесная отрицательная корреляция между уровнем содержания гидроперекисей и уровнем содержания жирных кислот семейства $\omega 9$ ($r = -0,93$).

Коэффициент насыщенности (отношение суммарного количества насыщенных кислот к ненасыщенным) в условиях инициации окислительных процессов *in vitro* выглядит следующим образом. Так, в ряду увеличения времени инкубации увеличивается насыщенность мембраны. Данная динамика обусловлена снижением ненасыщенных жирных кислот представителей семейства $\omega 3$ (α -линоленовой и докозапентаеновой кислот) и в меньшей степени за счет представителей семейства $\omega 6$ (γ -линоленовой и арахидоновой кислот).

Причины, вызывающие изменения в уровне содержания жирных кислот семейств $\omega 6$ и $\omega 9$ скорее всего идентичны причинам вызывающим изменения в уровне содержания жирных кислот $\omega 3$ -семейства и могут отличаться от них, возможно, только лишь скоростью и степенью деградации жирных кислот.

ВЫВОДЫ

1. Под влиянием окислительного стресса в условиях *in vitro* с использованием среды Фентона (Fe^{2+} , H_2O_2) осуществляются значительные изменения в жирно-кислотном составе мембран эритроцитов.

2. Отмечено существенное снижение уровня содержания ненасыщенных жирных кислот. Более выраженные изменения характерны для полиненасыщенных жирных кислот. В динамике инкубации эритроцитов в среде Фентона в течение 1, 2 и 24 часов отмечено снижение на 4 %, 20 % и 32 % соответственно, по сравнению с контрольной группой.

3. Из представителей семейств $\omega 3$, $\omega 6$ и $\omega 9$ отмечено более выраженное снижение уровня содержания жирных кислот представителей семейства $\omega 3$, содержащих в своем составе наибольшее число двойных связей. Изменение уровня содержания жирных кислот представителей семейства $\omega 3$ происходило на 16 %, 56 % и 67 % в условиях 1, 2 и 24 часов инкубации в среде Фентона.

4. Для представителей семейств $\omega 6$ и $\omega 9$ отмечено менее выраженное снижение уровня их содержания, в среднем на 5 %, 17 % и 31 % после 1, 2 и 24 часов инкубации в среде Фентона.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – С.39-40
2. Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. – М.: Наука, 1981. – 168 с.
3. Попичев М.И., Толкачева Н.В., Кулакова С.Н., Коношенко С.В. Влияние биопрепарата «Полиет» на показатели жирно-кислотного состава крови у спортсменов-волейболистов // Укр. биохим. журнал. – 1997. – Т.69, №4. – С.83-87.
4. Когтева И.С., Безуглов В.В. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы // Биохимия. – 1998. – Т.63, вып.1. – С. 6-15.
5. Левина Л.Д., Зуева В.В., Аставадурьян А.Г. Жирные кислоты в крови больных острым вирусным гепатитом // Лаб. дело. – 1981. – №11. – С.649-651.
6. Зенков И.А., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, вып. 3. – С.286-296.
7. Кармен Н.Б. Окислительная модификация мембран эритроцитов в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы и ее коррекция кюнидином // Бюлл. экп. биол. и мед. – 2003. – Т.136, №10. – С. 410-414.
8. Тищенко О.В., Кресюн В.Й. Мембранотропні ефекти нового похідного N-3 поліненасичених жирних кислот під час експериментального стресу // Укр. биохим. журнал. – 1995. – Т.67, №5. – С. 115-118.
9. Сим Э. Биохимия мембран. – М.: Медицина, 1985. – 250 с.
10. Мембраны и болезни / Под ред.Л. Бодис, Д.Ф.Хоффмана, А.Лифа. – М.: Медицина, 1980. – 185 с.
11. 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.
12. 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.
13. Morris W.R., Smith L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetates from lipids with boron fluoride methanol // J. Lipid Research. – 1964. – Vol. 5, № 4. – P.600-608.
14. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, вып. 1. – С. 24-26.
15. Ераносян К.В., Коношенко С.В. Пероксидна окисація ліпідів і стан антиоксидантної системи в еритроцитах в умовах ініціації процесів окиснення *in vitro* // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2004. – №3. – С. 39-44.
16. Ераносян К.В., Коношенко С.В. Перекисне окислення ліпидів в еритроцитах при ініціації окислювальних процесів *in vitro* і при патології // Ученые записки ТНУ. – 2004. – Т.17(56), № 1. – С.30-34.
17. Брюзгина Т.С., Амосова Е.Н., Лыховский О.И., Вретиц 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.

Поступила в редакцию 20.01.2006 г.