

УДК 612.354.1:615.917

НАРУШЕНИЯ БЕЛКОВО-ЛИПИДНОГО СПЕКТРА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ГЕПАТОПАТИИ, КОРРЕКЦИЯ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПРЕПАРАТА «ФОСФОГЛИВ»**Белоконева О.Н., Конопля А.И., Покровский М.В., Гаврилюк В.П., Долгарева С.А.**
ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск, e-mail: wvas@mail.ru

В статье изложены данные о нарушениях структурно-функциональных свойств эритроцитов при остром токсическом индометациновом поражении печени. В работе определена эффективность использования различных лекарственных форм «Фосфоглив» при остром токсическом поражении печени в коррекции белкового и липидного спектра мембран эритроцитов. Максимальной эффективностью в условиях отравления индометацином обладает «Фосфоглив для инъекций», минимальной – «Фосфоглив», а «Фосфоглив Форте» занимает промежуточное положение. Полученные результаты диктуют необходимость апробирования данных форм препарата «Фосфоглив» в клинических исследованиях.

Ключевые слова: индометацин, токсическое поражение печени, фосфоглив**INFRINGEMENTS OF PROTEINES AND LIPIDIC SPECTRUM OF THE MEMBRANE OF ERYTHROCYTES AT EXPERIMENTAL SHARP MEDICINAL HEPATOPATHY, CORRECTION BY VARIOUS FORMS OF THE DRUG «FOSFOGLIV»****Belokoneva O.N., Konoplya A.I., Pokrovskiy M.V., Gavrioliouk V.P., Dolgareva S.A.**
Kursk state medical university, Kursk, e-mail: wvas@mail.ru

In article the data about infringements structural and functional properties of erythrocytes is stated at sharp toxic indometacin liver lesion. In work efficacy of use of various medicinal forms «Fosfogliv» is defined at the sharp toxic lesion of the liver in correction proteines and lipidic spectrum of membranes of erythrocytes. Peak efficiency in the conditions of poisoning with indometacin «Fosfogliv for injections», minimum – «Fosfogliv» and «Fosfogliv Forte» is intermediate. The received results dictate necessity of approbation of the given forms of a preparation of «Fosfogliv» for clinical researches.

Keywords: indometacin, toxic lesion of the liver, fosfogliv

С позиции патологии клеточных и субклеточных процессов многие заболевания имеют общие патогенетические звенья даже в тех случаях, когда их клинические проявления, связанные с поражением различных органов и тканей, не однотипны. В связи с тем, что практически любая патология реализуется на клеточном уровне, а универсальным для всех клеток является их мембранное построение, то становится понятным, что нарушения в структуре цитоплазматических и внутриклеточных биомембран являются общими патогенетическими элементами любого болезненного процесса [4, 6].

В одних случаях повреждение клеточной оболочки может быть первичным и влечет за собой каскад специфических изменений (например, усиленная пролиферация клеток, нарушение агрегации эритроцитов и др.), в других – оказывается вторичным, как результат нарушения регуляторных процессов, что способствует многократному усилению патологических механизмов вследствие неизбежного включения цепи связанных между собой внутриклеточных сигнальных процессов [2, 5, 15]. При этом возможно нарушение транскрипции генов определенных функциональных белков

или ферментов, приводящее, в свою очередь, к той или иной степени клеточной дисрегуляции. Указанное обстоятельство обуславливает теоретическую универсальность и эффективность лекарственных препаратов, направленных на репарацию поврежденных клеточных мембран. В этом смысле на первый план можно поставить препараты, созданные на основе фосфолипидов – универсальных компонентов всех клеточных оболочек [6, 13, 14].

Одним из таких препаратов является «Фосфоглив» – новое лекарственное средство, которое содержит два активно действующих вещества: фосфатидилхолин и глицерризиновую кислоту, что позволяет выполнять роль «мембранного клея», способного репарировать дефекты поврежденных мембран. Такое удачное сочетание позволили «Фосфогливу» хорошо зарекомендовать себя в качестве высокоэффективного гепатопротектора [3, 14].

Цель исследования – установление эффективности использования различных лекарственных форм препарата «Фосфоглив» в коррекции белково-липидного спектра мембран красных клеток крови у животных в условиях острого индометацинового токсического поражения печени.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводили на 178 здоровых половозрелых крысах линии Вистар, массой 180–210 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Все исследования проводили в одно и то же время суток, с 8 до 12 ч, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Острое токсическое поражение печени (ОТПП) моделировали внутрижелудочным введением индометацина (трехкратно, с интервалом 24 ч, по 5 мг/кг) [1]. Токсикант вводили в последние 3 дня получения препаратов «Фосфоглив», который вводили через 24 часа внутрижелудочно («Фосфоглив» и «Фосфоглив Форте» в 1%-й крахмальной суспензии) и внутривенно («Фосфоглив для инъекций») по 1500 мг/кг в перерасчете на эссенциальные фосфолипиды в течение 14 дней.

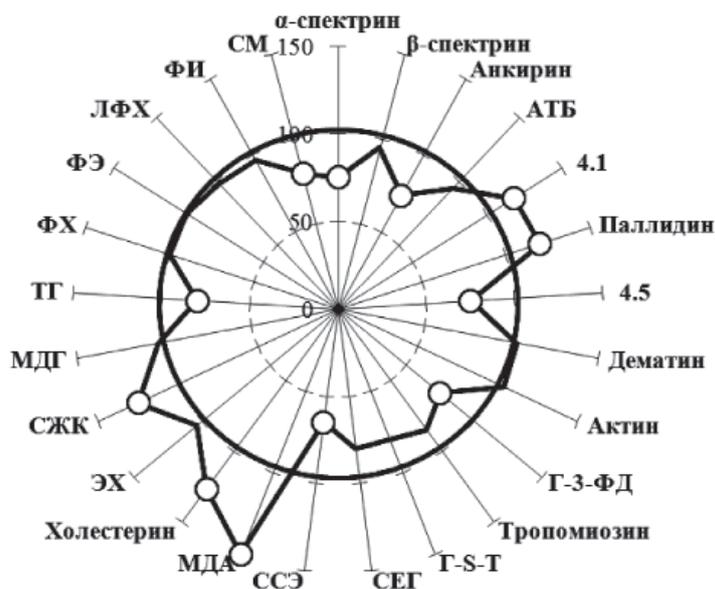
Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу E. Veutler [16]. Определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) [12] и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕГ) [11].

О функциональном состоянии эритроцитов судили также по накоплению малонового диальдегида (МДА) [2, 10].

Мембраны эритроцитов получали методом G.T. Dodge [17]. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных пластинах полиакриламидного геля по методу U.K. Laemmli [19]. Белки окрашивали кумаси голубым R-250 по модифицированной методике G. Fairbanks [18]. Липиды выделяли методом тонкослойной хроматографии [7]. Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы [9].

Результаты исследования и их обсуждение

В условиях ОТПП, вызванного введением индометацина, у животных установлено снижение представительности α -спектрина, анкирина, белка полосы 4.5, Г-3-ФД, триглицеридов, сфингомиелинов и повышение количества белка полосы 4.1, паллидина, холестерина, свободных жирных кислот, что приводит к снижению общей сорбционной способности эритроцитов и накоплению в них МДА (рисунок).



Представительность белков и липидов в мембране эритроцитов, ССЭ, СЕГ и концентрация МДА у животных в условиях ОТПП:

- 1 – радиус окружности – показатели у контрольной группы животных (1 группа);
 2 ———— – показатели у животных с ОТПП (2 группа); 3 ○ – $p < 0,05$ между показателями по отношению к 1 группе; 4 – АТБ – анионтранспортный белок,
 Г-3-ФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, Г-S-T – глутатион-S-трансфераза;
 ЭХ – эфиры холестерина, СЖК – свободные жирные кислоты, МДГ – моно- и диглицериды,
 ТГ – триглицериды, ФХ – фосфатидилхоллин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин,
 ЛФХ – лизофосфатидилхоллин, ФИ – фосфатидилинозитол, СМ – сфингомиелин

Известно, что фосфолипиды, составляющие существенную часть всех мембранных систем и органелл, играют основную роль в процессах трансмембранного обмена, детоксикации, а также регенерации

клеток [8]. Патология печени, независимо от этиологии процесса, сопровождается повреждением мембран гепатоцитов и органелл, повышением их прочности, нарушением текучести, что в большой степени

связано с потерей фосфолипидов. Известно также, что молекулы полиненасыщенного фосфатидилхолина, обладая высоким энергетическим потенциалом, в неизменном виде встраиваются в мембраны гепатоцитов, избавляя таким образом печень от необходимости затрачивать большое количество энергии на формирование структурных и функциональных элементов мембранных систем [8, 14].

Во многих исследованиях показано воздействие полиненасыщенных эссенциальных фосфолипидов на цитоплазматическую мембрану клеток [8, 14, 15], в связи с чем нами с целью коррекции структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов использовались различные формы препарата «Фосфоглив».

Введение животным «Фосфоглива» регос на фоне токсического воздействия индометацина позволило нормализовать в мембране красных клеток крови концентрацию

триглицеридов и частично скорректировать представительность α -спектрина, анкирина, белка полосы 4.5, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, свободных жирных кислот и МДА внутри клеток (таблица).

Применение «Фосфоглива Форте» у животных в условиях ОТПП дополнительно, в отличие от предыдущей группы животных, нормализует в эритроцитарной мембране уровень анкирина и корректирует представительность паллидина и повышает, но не до уровня нормы, ССЭ (см. таблицу).

Инъекции «Фосфоглива» более эффективно корректируют и нормализуют нарушенные показатели белково-липидного спектра мембран красных клеток крови в условиях ОТПП: нормализуют количество паллидина, белка полосы 4.5, Г-3-ФД, холестерина и сфингомиелина, корректируя остальные измененные показатели, за исключением представительности белка полосы 4.1 (см. таблицу).

Структурно-функциональные свойства красных клеток крови у животных в условиях ОТПП и введения «Фосфоглива»

| Измененные показатели | ОТПП | ОТПП + «Фосфоглив» | ОТПП + «Фосфоглив-Форте» | ОТПП + «Фосфоглив для инъекций» |
|--------------------------|------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|
| α -спектрин | ↓ | коррекция | коррекция | коррекция |
| Анкирин | ↓ | коррекция | нормализация | нормализация |
| 4.1 | ↑ | – | – | – |
| Паллидин | ↑ | – | коррекция | нормализация |
| 4.5 | ↓ | коррекция | коррекция | нормализация |
| Г-3-ФД | ↓ | коррекция | коррекция | нормализация |
| ССЭ | ↓ | – | коррекция | коррекция |
| МДА | ↑ | коррекция | коррекция | коррекция |
| Холестерин | ↑ | – | – | нормализация |
| Свободные жирные кислоты | ↑ | коррекция | коррекция | коррекция |
| Триглицериды | ↓ | нормализация | нормализация | нормализация |
| Сфингомиелин | ↓ | – | – | нормализация |

Примечание: ↑ – повышение; ↓ – снижение; в таблице представлены показатели, измененные в условиях ОТПП.

Известно, что между мембранами эритроцитов и компонентами липидного спектра сыворотки крови постоянно происходит обмен, потому встраивание фосфатидилхолина в мембраны эритроцитов с последующим изменением их параметров является вполне закономерным. Между эритроцитами и адсорбированными на их поверхности липопротеидами происходит постоянный обмен холестерина, фосфолипидов [8]. Вероятно, экзогенный полиненасыщенный фосфатидилхолин и сфингомиелин замещают эндогенный насыщенный фосфатидилхолин и сфингомиелин не только в мембране гепатоцитов [8, 14], но и эритроцитов.

Такое замещение приводит к повышению текучести клеточной мембраны и стимуляции связанных с мембраной ферментных систем, в частности кальцийзависимой АТФ-азы. Повышенная активность ферментов в сочетании с возможным снижением потребности в образовании эндогенных фосфолипидов способна облегчать утилизацию энергии процессами, участвующими в восстановлении клетки [8, 15]. Подобными процессами, вероятно, объясняются наблюдаемые при назначении эссенциальных фосфолипидов повышение пластичности эритроцитов, снижение жесткости и вязкости клеток, повышение их энергетического

потенциала, отражаемого в увеличении количества дискоцитов, нарастании поляризуемости.

Встраиваясь в мембраны эритроцитов, эссенциальные фосфолипиды, очевидно, способны восстанавливать активность ферментов антиоксидантной системы, угнетать перекисное окисление липидов мембран, тем самым стабилизируя мембрану. Следствием этого, вероятно, является снижение склонности мембран эритроцитов к избыточному гемолизу и последующей агрегации клеток. Эссенциальные фосфолипиды, вероятно, способствуют и восстановлению отрицательного поверхностного заряда эритроцитов, который отражается скоростью движения эритроцитов к электродам.

Подобные позитивные изменения на фоне использования препарата «Фосфоглив» параметров эритроцитов приводят к уменьшению степени микроциркуляторных нарушений, уровня тканевой гипоксии, которая является важным фактором прогрессирования фиброза печени при острой токсической гепатопатии [8, 14, 15].

Заключение

Представленные выше данные позволяют сделать заключение, что в условиях острой лекарственной (индометациновой) токсической гепатопатии имеет место нарушение метаболического гомеостаза, что проявляется в изменении структурно-функциональных свойств эритроцитов, в первую очередь, белково-липидного спектра. При этом использование различных форм препарата «Фосфоглива» позволяет корригировать и нормализовывать представительность белков и липидов в мембране красных клеток крови. Максимальной эффективностью в условиях ОТПП обладает «Фосфоглив для инъекций», минимальной – «Фосфоглив», тогда как «Фосфоглив Форте» занимает промежуточное положение.

Полученные результаты диктуют необходимость апробирования данных форм препарата «Фосфоглив» в клинических исследованиях с целью разработки эффективных способов фармакокоррекции метаболических нарушений при острой токсической гепатопатии.

Список литературы

1. Алексеева И.Н., Брызгина Т.М. Печень и иммунологическая реактивность. – Киев, 1991. – 168 с.
2. Гаврилюк В.П., Назаренко П.М., Конопля А.И. Структурно-функциональные нарушения эритроцитов и их коррекция у больных с легким и тяжелым течением острого панкреатита // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2007. – № 3. – С. 29–37.
3. Кедровская, Н.А. Иммуномодулирующие и гепатопротекторные эффекты различных лекарственных форм

«Фосфоглива» в условиях индометацинового токсического поражения печени / Н.А. Кедровская, О.В. Белоконова // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2009. – № 4. – С. 5–10.

4. Участие лимфатической системы в регуляции окислительного гомеостаза у крыс при хроническом токсическом поражении печени / М.А. Колпаков, Ю.В. Башкирова, С.М. Тарабукина, М.С. Любарский // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2006. – Т. 4, №2. – С. 64–68.

5. Конопля А.И. Взаимосвязь структуры и функции эритроцитов с иммунным гомеостазом. – Курск: КГМУ, 2008. – 40 с.

6. Применение фосфолипидного гепатопротекторного препарата Фосфоглив у больных Псориазическим артритом (предварительные результаты) / Т.В. Коротчаева, Е.Л. Насонов, О.М. Ипатова и др. // Научно-практическая ревматология. – 2004. – № 3. – С. 40–45.

7. Крылов В.И., Виноградов А.Ф., Ефремова С.И. Метод тонкослойной хроматографии липидов мембран эритроцитов // Лаб. дело. – 1984. – № 4. – С. 205–206.

8. Обоснование применения эссенциальных фосфолипидов при хронических заболеваниях печени: динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов / С.А. Курилович, М.В. Кручинина, А.А. Громов и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – №11. – С. 44–52.

9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 243 с.

10. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.

11. Семко Г.А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Украинский биохимический журнал. – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 113–118.

12. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лабораторное дело. – 1988. – № 9. – С. 22–24.

13. Топорков А.С. Алгоритм диагностики и лечения токсических и алкогольных поражений печени // Русский медицинский журнал. – 2004. – № 7. – С. 47–53.

14. Учайкин В.Ф., Ковалев О.Б. Применение фосфоглива при острых и хронических вирусных гепатитах у детей // Детские инфекции. – 2006. – №1. – С. 38–42.

15. Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. Липиды эритроцитов крови и их функциональная активность // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, №6. – С. 587–602.

16. Beutler E. How do red cell enzymes age a new perspective // Brit. J. Haemat. – 1985. – Vol. 61. – P. 377–384.

17. Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.

18. Fairbanks G., Steck T. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – Vol. 10. – P. 2606–2616.

19. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680.

Рецензенты:

Калужин О.В., д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ГОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравразвития России», г. Москва;

Афанасьев Ю.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой внутренних болезней №1 ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный университет», г. Белгород.

Работа поступила в редакцию 10.11.2011.