

Влияние α -токоферола и его производного на структурные компоненты митохондрий клеток печени при токсическом гепатите

Л. Б. Бондаренко, И. С. Блажчук, В. Н. Коваленко, И. В. Кузьменко¹

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины
252057, Киев, ул. Э. Потье, 14

¹ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
252030, Киев, ул. Леонтовича, 30

В опытах на белых крысах-самцах массой 180—250 г показано, что при хроническом введении 10% этанола с тетрахлорметаном снижается содержание общих фосфолипидов и свободного холестерина, а также активность НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса в митохондриях клеток печени. В результате проведенных экспериментов показана способность витамина E и его производного с укороченной боковой цепью нормализовать как содержание фосфолипидов и различных фракций холестерина, так и активность НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите. При этом действие производного витамина E с укороченной боковой цепью на уровень этерифицированного холестерина, коэффициент этерификации и активность НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса более выражены по сравнению с самим витамином E.

Введение. Холестерин и фосфолипиды — основные компоненты липидного бислоя биологических мембран [1, 2]. От их количественного и качественного составов в организме и клетке зависят не только физико-химические свойства мембран (вязкость, упругость, текучесть и др.), но и функционирование мембраносвязанных ферментных систем, регулирующих различные стороны обмена в организме [3].

Развитие многих патологических процессов в организме сопровождается нарушением метаболизма названных соединений [1—3]. В частности, нарушения обмена фосфолипидов отмечают при тяжелых формах сахарного диабета, нефрозах, хронических нефритах, различных патологиях печени, атеросклерозе, дистрофии, малокровии [4]. Большинство патологий жирового обмена, атеросклероза, гепатиты различной этиологии сопровождаются нарушениями метаболизма холестерина [5].

Серьезные изменения как в метаболизме фос-

фолипидов и холестерина, так и в мембранных структурах клетки происходят в ходе развития защитных реакций организма на воздействие ксенобиотиков [1, 2, 4]. Отклонения в липидном составе мембран могут наблюдаться в митохондриях гепатоцитов, поскольку реализация адаптивных механизмов на первом этапе осуществляется именно через развитие структурно-функциональных перестроек этих органелл в печени — органе метаболизма ксенобиотиков [6, 7]. Все это может повлечь изменение ферментативных активностей, локализованных в мембранах [8].

Учитывая, что витамин E участвует в процессах перекисного окисления липидов и стабилизации клеточных мембран [9], представляло интерес в эксперименте на модели этанол-тетрахлорметан-индуцированного гепатита выявить способность как самого α -токоферолацетата, так и его производного с укороченной боковой цепью вызывать изменения в содержании фосфолипидов и фракций холестерина в митохондриях клеток печени, а также влиять на ферментативную активность мембраносвязанной НАДН-цитохром с-оксидоредуктазной системы.

Материалы и методы. Эксперименты осуществляли на белых крысах-самцах массой 180—250 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные разделяли на четыре группы: 1-я — интактные, 2-я — получавшие этанол с тетрахлорметаном, 3-я и 4-я — получавшие данные гепатотоксины и витамин Е или его производное с укороченной боковой цепью соответственно. Гепатотоксины вводили в течение 45 дней трижды в неделю: 1 %-й раствор этанола из расчета 35 мг/кг массы тела и с интервалом 20—30 мин 20 %-й масляный раствор тетрахлорметана из расчета 20 мг/кг массы тела. Препараты витамина Е и его производного с укороченной боковой цепью вводили перорально (в виде масляных растворов) на протяжении последних 10 дней ежедневно из расчета 10 мг/кг массы тела за 30 мин до введения гепатотоксинов. На 46-й день эксперимента животных декапитировали. Развитие хронического токсического гепатита контролировали по комплексу общепринятых биохимических и патоморфологических показателей [10].

Извлеченную печень промывали через воротную вену охлажденным 1 %-м раствором КСl, гомогенизировали в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,4). Митохондриальную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования [11]. Активность НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса регистрировали по методу [12] и выражали в нмолях окисленного субстрата в 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури [13]. Липидные экстракты митохондрий получали по модифицированному методу Фолча [4]. Содержание различных фракций холестерина выясняли по методу [4], основанному на их взаимодействии с хлористым железом, уксусной и серной кислотами. Коэффициент этерификации, являющийся важной функциональной пробой печени, представляли как отношение эфирносвязанного холестерина к общему [4]. Состав общих фосфолипидов определяли, как в работе [4].

Результаты и обсуждение. Результаты изучения содержания общих фосфолипидов в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите и введении витамина Е или его производного приведены на рис. 1. Из полученных данных видно, что при хроническом гепатите отмечается достоверное снижение содержания общих фосфолипидов в митохондриях клеток печени крыс. При введении животным витамина Е и его производного на фоне токсического гепатита имеется тенденция к повышению содержания общих фосфолипидов в митохондриальной фракции по сравнению с токсическим гепатитом. Полученные нами *in vivo* резуль-

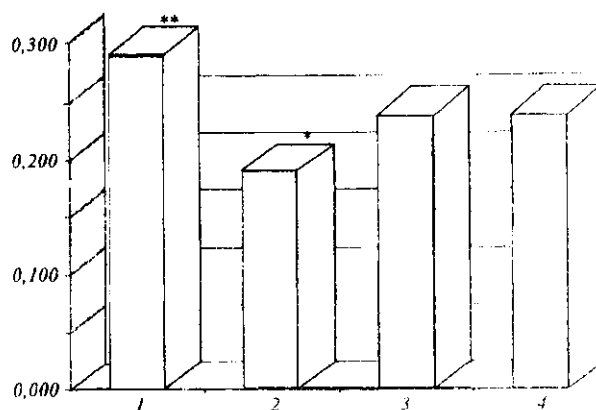


Рис. 1. Содержание общих фосфолипидов в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите и после введения витамина Е или его производного ($M \pm m$, $n=6$, мг/мг): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е; * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

таты вполне согласуются с ранее полученными *in vitro* и *in vivo* данными о способности витамина Е и его производных с различной длиной боковой цепи стабилизировать мембраны митохондрий в условиях инициированного ионами железа перекисного окисления липидов и подавлять последнее [14—16]. Наблюдаемый эффект витамина Е и его производного может быть обусловлен как проявлением их способности подавлять процессы перекисного окисления липидов, резкая интенсификация которых отмечается в ходе развития токсического гепатита [8, 10, 15], так и непосредственным участием данных соединений в стабилизации структуры мембран митохондрий за счет взаимодействия боковой изофитильной цепи с полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов мембран [9, 14].

На рис. 2 показаны результаты изучения содержания свободного, общего и этерифицированного холестерина в митохондриальной фракции клеток печени крыс при токсическом гепатите и после введения витамина Е или его производного. При токсическом гепатите отмечено достоверное снижение содержания в митохондриях клеток печени свободного холестерина на 35 %. При одновременном уменьшении содержания фосфолипидов (см. рис. 1) это может привести к заметному изменению физико-химических свойств мембран [3, 5] и нарушению нормального функционирования мембра-

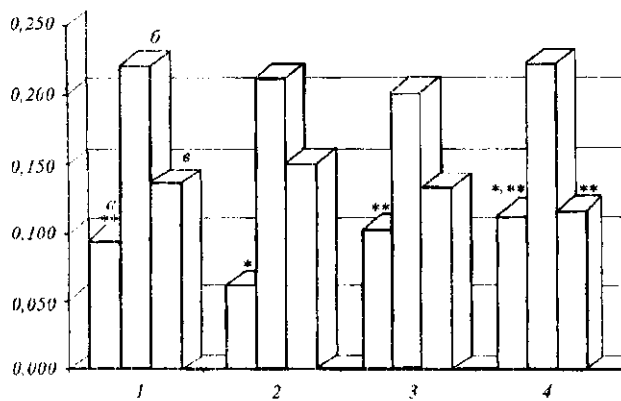


Рис. 2. Содержание различных фракций холестерина в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите и после введения витамина Е или его производного ($M \pm m$, $n=6$, мг/мг): а — свободный холестерин; б — общий холестерин; в — этерифицированный холестерин (1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е; * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

носвязанных ферментов [2, 6]. Введение витамина Е на фоне токсического гепатита приводит к достоверному повышению содержания свободного холестерина в мембранах митохондрий до уровня нормы. Производное витамина Е оказывает еще более выраженный эффект: при его введении на фоне токсического гепатита отмечается достоверное изменение содержания не только свободного, но и этерифицированного холестерина. Однако при этом коэффициент этерификации снижается, т. е. доля свободного холестерина возрастает (рис. 3). Учитывая, что именно свободный холестерин влияет на стабилизацию липидного бислоя мембран [5], полученные нами результаты позволяют предположить наличие более выраженного в условиях хронического токсического гепатита антиоксидантного и мембраностабилизирующего эффекта у производного витамина по сравнению с витамином Е. Подобные различия в эффектах витамина Е и его производного отмечены и ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при исследовании их влияния на показатели антиоксидантной активности [15, 16].

Результаты изучения активности НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса при токсическом гепатите и введении витамина Е или его производного с укороченной боковой цепью представлены на рис. 4. Из приведенных данных видно,

что при хроническом токсическом гепатите ферментативная активность снижалась на 32%. При введении витамина Е (на фоне токсического гепатита) отмечена тенденция к восстановлению активности фермента до нормы, а при введении производного витамина — ферментативная активность достоверно не отличалась от уровня нормы. Таким образом, видимо, более выраженный эффект производного витамина Е на липидный состав митохондрий по сравнению с самим витамином приводит к более полной коррекции нарушений в функционировании такого мембраносвязанного ферментативного комплекса, как НАДН-цитохром с-оксидоредуктазная система.

Выявленные нами изменения содержания различных фракций липидов в мембранах митохондрий клеток печени при токсическом гепатите могут быть обусловлены мембраноповреждающим эффектом тетрахлорметана (в комплексе с этанолом), а также стимуляцией им процессов перекисного окисления липидов [1—3, 5, 17], что ведет к изменениям мембранного окружения и функционирования встроженных в него ферментов, образованию комплексов белок — липид, полимеризации белков и другим модификациям их структуры [18].

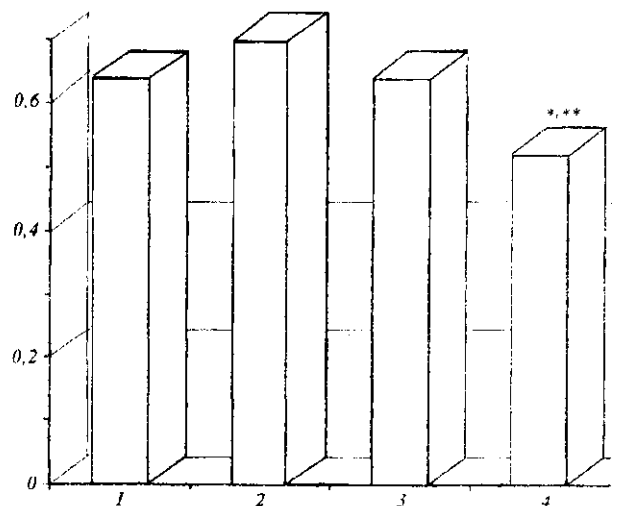


Рис. 3. Коэффициент этерификации холестерина в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите и после введения витамина Е или его производного ($M \pm m$, $n=6$, разы): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е; * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

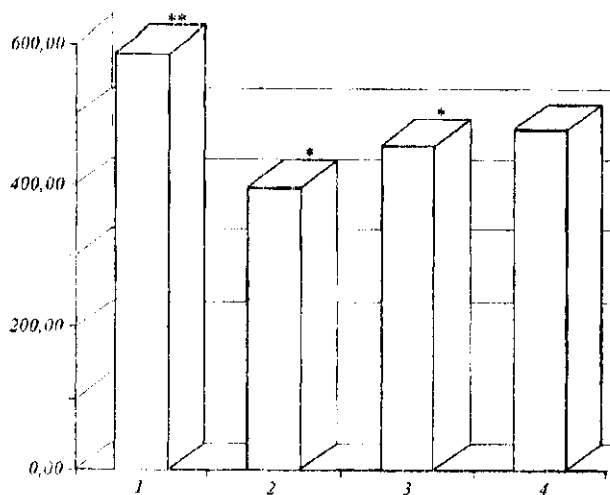


Рис. 4. НАДН-цитохром с-оксидоредуктазная активность в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите и после введения витамина Е или его производного ($M \pm m$, $n = 6$, в нмоль окисленного субстрата за 1 мин на 1 мг белка): 1 — интактные животные; 2 — токсический гепатит; 3 — токсический гепатит + витамин Е; 4 — токсический гепатит + производное витамина Е; * достоверные отличия по сравнению с группой 1 и ** с токсическим гепатитом

Это предположение вполне согласуется и с результатами авторов, показавших, что под воздействием хлорохина происходит снижение уровня холестерина в митохондриях клеток печени, сопровождаемое снижением активности НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохром с-оксидазы [19].

Способность α -токоферола, как и его производного с укороченной боковой цепью, нормализовать содержание различных липидов в митохондриальных структурах *in vivo* свидетельствует о том, что стабилизирующее действие витамина Е и его производных на структуру биологических мембран [9] может осуществляться не только за счет прямого физико-химического взаимодействия между фитильной боковой цепью данного соединения и углеводородной цепью остатков полиненасыщенных жирных кислот, но и вследствие действия на обмен липидов. Наши данные о более выраженном эффекте на изучаемые показатели производного витамина Е с укороченной боковой цепью по сравнению с витамином Е согласуются с результатами исследований, в которых отмечена более высокая биологическая активность данного соединения в различных тестах *in vivo* и *in vitro* [9, 15, 16].

Большая эффективность производного витамина Е с укороченной боковой цепью, возможно, обусловлена тем, что данное соединение в силу особенностей структуры его молекулы легче проникает в биомембраны, образует более прочный комплекс с ненасыщенной жирной кислотой за счет взаимодействия метильных групп его хроманового кольца и разделенных метиленовыми группами *цис*-двойных связей ненасыщенной жирной кислоты, а продукты свободнорадикального окисления этого производного α -токоферола легче регенерируются [9, 15, 16].

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые показана способность витамина Е и его короткоцепочечного аналога нормализовать содержание фосфолипидов, свободного и этерифицированного холестерина и активности НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса в митохондриях клеток печени крыс при токсическом гепатите. При этом действие производного витамина Е с укороченной боковой цепью на уровень этерифицированного холестерина, коэффициент этерификации и активность НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплекса более выражено по сравнению с самим витамином Е.

Л. Б. Бондаренко, Л. С. Блажчук, В. М. Коваленко, И. В. Кузьменко

Вплив α -токоферолу і його похідного на структурні компоненти мембран мітохондрій клітин печінки при токсичному гепатиті

Резюме

У досліджах на білих щурах-самцях масою 180–250 г показано, що при хронічному введенні *per os* етанолу з тетрахлорметаном зменшується вміст загальних фосфоліпідів і різних фракцій холестерину, а також активність НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплексу у мітохондріях клітин печінки. В результаті проведених експериментів показано здатність вітаміну Е і його похідного з вкороченим бічним ланцюгом нормалізувати як вміст фосфоліпідів і різних фракцій холестерину, так і активність НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплексу у мітохондріях клітин печінки щурів при токсичному гепатиті. При цьому дія похідного вітаміну Е на рівень етерифікованого холестерину, коефіцієнт етерифікації і активність НАДН-цитохром с-оксидоредуктазного комплексу виразніша, ніж вплив самого вітаміну Е.

L. B. Bondarenko, L. S. Blazhchuk, V. N. Kovalenko, I. V. Kuzmenko

Influence of α -tocopherol and its derivative on components of liver cell mitochondria membranes during toxic hepatitis

Summary

In experiments on rats (180–250 g b. w.) influence of α -tocopherol and its derivative on phospholipids, free, esterified and total cholesterol, DPNH-cytochrome c oxidoreductase (complex I—III) of

respiratory chain) of liver cell mitochondria membranes during toxic hepatitis have been studied. It was shown that α -tocopherol and its shortchain derivative in dose 10 mg/kg b. w. could normalise contents of phospholipids and cholesterol and activity of DPNH-cytochrome c oxidoreductase during this pathology.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лескова Т. Ф., Архипенко Ю. В. Фосфолипидный состав митохондрий печени при экспериментальном геморрагическом шоке // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1997.—№ 7.—С. 43—45.
2. Carrasco M. P., Sanchez-Amate M. C., Segovia J. L. et al. Studies on phospholipid biosynthesis in hepatocytes from alcoholic rats by using radiolabelled exogenous precursors // *Lipids*.—1996.—31, N 4.—P 393—397.
3. Алберте Б. Молекулярная биология клетки.—М.: Мир, 1994.—516 с.
4. Колб В. Г., Камышиных В. С. Клиническая биохимия.—Минск: Беларусь, 1976.—312 с.
5. Фишгин Л. К. Обмен холестерина и его регуляция.—Киев: Выща шк., 1980.—168 с.
6. Мануйлов В. Г., Иванова В. Ф., Пузырева А. А. Структурный гомеостаз некоторых органов при действии антропогенных факторов // *Гигиена и санитария*.—1994.—№ 1.—С. 30—32.
7. Jacobson M. D., Raff M. C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen // *Nature*.—1995.—374.—P. 814—816.
8. Легонькова Л. Ф., Бушма М. И., Зверинский И. В. и др. Влияние никотинамида, метионина и α -токоферола на активность конъюгирующей и монооксигеназной систем печени и перекисное окисление липидов при гепатозепатите у крыс // *Эксперим. и клин. фармакология*.—1997.—60.—С. 68—71.
9. Спиричев В. Б., Конь И. Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов.—М.: ВИНТИ, 1989.—С. 160—219 (Итоги науки и техники; Т. 37).
10. Скакун Н. П., Писько Г. Т., Мосейчук И. П. Поражение печени четыреххлористым углеродом.—М.: НИИТЭХИМ, 1989.—108 с.
11. Schneider V. C. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction // *J. Biol. Chem.*—1948.—176.—P 259—262.
12. Hatefi J., Rieske J. S. The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I—III of respiratory chain) // *Meth. Enzymol.*—1967.—10.—P. 225—231.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—P. 265—275.
14. Кузьменко И. В., Клименко Е. П., Алексеев С. М. и др. Влияние α -токоферола и его аналогов на стабильность мембран митохондрий *in vitro* // *Биол. мембраны*.—1994.—11, № 2.—С. 169—173.
15. Кузьменко И. В., Куница Н. И., Донченко Г. В. Влияние токоферола, его аналогов и антиоксиданта ионола на перекисное окисление липидов *in vitro* // *Укр. биохим. журн.*—1993.—65, № 3.—С. 94—99.
16. Куница Н. И., Кузьменко И. В., Алексеев С. М. и др. Участие токоферола и его аналогов в процессах перекисного окисления липидов и транспорте электронов в митохондриях печени крыс *in vivo* // *Биохимия*.—1993.—58, № 11.—С. 1709—1713.
17. Velez M., Lillo M. P., Acuna A. U. et al. Cholesterol effect on the physical state of lipid multibilayers from the platelet plasma membrane by time-resolved fluorescence // *Biochim. et biophys. acta*.—1995.—1235, N 2.—P. 343—350.
18. Lee H.-C., Wei Y.-H. Role of mitochondria in human aging // *J. Biomed. Sci.*—1997.—N 4.—P. 319—326.
19. Deepalakshmi P. D., Parasakthy K., Shanthi S. et al. Effect of chloroquine on rat liver mitochondria // *Indian J. Exp. Biol.*—1994.—32, N 1.—P. 797—799.

Поступила в редакцию 14.01.99