

УДК 616.36-002-099

## ДИНАМІКА ПОРУШЕНЬ ФОСФОЛІПІДНОГО ПУЛУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ

Чабан Т. В., Солтик С. М.

*Одеський державний медичний університет, кафедра інфекційних хвороб з епідеміологією, м. Одеса*

**Резюме:** експериментальні дослідження проведені на 120 щурах-самцях, яким одноразово внутрішньошлунково вводили  $CCl_4$ . Досліджували фосфоліпідний склад мембран гепатоцитів щурів через 24, 48, 72 і 168 годин після введення  $CCl_4$ . Встановлено зниження кількості загальних фосфоліпідів, перерозподіл відносної кількості окремих фракцій фосфоліпідів, а також збільшення вмісту загального холестерину у мембранах гепатоцитів експериментальних тварин.

**Ключові слова:** токсичний гепатит, чотирихлористий вуглець, фосфоліпіди

**Вступ.** Одним з інформативних показників стану організму за умов ендогенного та екзогенного впливу є структурно-функціональна характеристика біологічних мембран. Особливу актуальність вивченню мембран надає їх значення у функціонуванні всіх клітин, систем і організму в цілому. Плазматичні мембрани забезпечують важливішу умову існування біологічних об'єктів – автономність і тісний зв'язок із навколишнім середовищем, виконує бар'єрну, механічну, енергетичну, комунікативну та інші функції [1, 3].

Універсальною причиною розвитку гострих і хронічних уражень печінки є дефіцит фосфоліпідів (ФЛ). ФЛ або фосфогліцериди належать до класу високоспеціалізованих ліпідів. Їх також називають есенціальними, тобто незамінними, так як вони у своєму складі містять незамінні вищі жирні кислоти, які не синтезуються в організмі людини. Разом із холестерином вони служать основою клітинних мембран і мембран їх органел. Головною їх функцією являється формування ліпідного біошару мембран – основи, на якій відбуваються найважливіші процеси життєдіяльності. Вивчення та з'ясування основних змін, що відбуваються у мембранах дозволяє поглибити знання про патологію клітини, розкрити механізми розвитку і прогресування окремих захворювань [2, 3, 6, 7].

Важливе значення для практичної охорони здоров'я має вивчення процесу відновлення патологічно зміненої печінки в умовах експерименту. Гарною моделлю змін, що відбуваються у печінці при різних захворюваннях може бути токсичне ураження, спричинене введенням чотирихлористого вуглецю ( $CCl_4$ ). Це обумовлено тим, що комплекс морфологічних і біохімічних порушень, які розвиваються за умов ураження печінки  $CCl_4$  не є строго специфічним, а характерним для багатьох захворювань печінки [4, 5, 8]. Вивчення порушень, що відбуваються у гепатоцитах дозволить висвітлити невідомі раніше ланки патогенезу гепатиту, викликаного  $CCl_4$ , вдосконалити існуючі методи лікування.

**Мета дослідження:** вивчити вміст загальних

ФЛ та визначити фосфоліпідний склад у мембранах гепатоцитів щурів при токсичному гепатиті, спричиненому  $CCl_4$ .

**Матеріали та методи.** Для виконання роботи проведені експериментальні дослідження на 120 статевозрілих щурах – самцях масою 180 – 200 грамів. Всім тваринам внутрішньошлунково одноразово вводили  $CCl_4$  дозою 5 мг/кг маси тварини у вигляді 50 % масляного розчину, що відтворювало гострий гепатит – експериментальна група. Контрольну групу склали 30 інтактних тварин.

Після введення чотирихлористого вуглецю досліджували фосфоліпідний склад мембран гепатоцитів щурів через 24, 48, 72 і 168 годин. Після декапітації тварин негайно проводили розтин черевної порожнини і забирали печінку, тканину якої промивали тричі охолодженим фізіологічним розчином, зважували на торзійних вагах.

Для виділення фракції ФЛ використовували загальну ліпідну фракцію, вилучену із тканин за методом Фолча. Виділення фракції фосфоліпідів здійснювали за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Розподіл ФЛ на окремі фракції проводили на скляних пластинках із застосуванням 2 систем розчинників. Такий метод дозволяв розділити ФЛ на наступні фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), сфінгомієлін (СФМ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноланін (ФЕА), фосфатидилсерин (ФС) та інші. Величини  $R_f$  окремих фракцій ФЛ склали: ЛФХ – 0,17, СФМ – 0,28, ФХ – 0,43, ФЕА – 0,53, ФС – 0,10. Кількість ФЛ оцінювали за реакцією взаємодії неорганічного фосфату з молібдатом амонію. Для визначення кількості загального холестерину (ХС) використовували уніфікований метод за реакцією з хлорним валізом після екстракції ізопропанолом.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали на персональному комп'ютері Intel Celeron 2300 за допомогою програм Microsoft Office 2000, Statistica + for Windows. Бази даних формували в таблицях Microsoft Excel.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У результаті проведених досліджень встановлено, що

ведення чотирхлористого вуглецю призводило до змін вмісту загальних ФЛ (таблиця 1). Так, кількість загальних ФЛ на першу добу експерименту зменшувалася в 1,7 разів, на другу – в 1,9 разу. На 3 добу гострого токсичного гепатиту кількість загальних ФЛ складала  $(11,17 \pm 0,94)$  мг/г тканини, що було у 2,3 разу нижче ніж у інтактних тварин ( $p < 0,05$ ).

Після введення тваринам  $CCl_4$  рівень загального ХС, навпроти, збільшувався (див. табл. 1). Слід відмітити, що найвиразніші зміни концентрації ХС відмічені у щурів з токсичним гепатитом також на 3 добу від початку експерименту: отримані результати в 1,8 разу перевищували показники тварин контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 1

Динаміка вмісту загальних ФЛ, ХС і співвідношення ХС/ФЛ у печінці щурів при гострому токсичному гепатиті, викликаному  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )

| Умови експерименту      | Загальні ФЛ, мг/г тканини | Загальний ХС, мг/г тканини | ХС/ФЛ |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|-------|
| 24 години (n=30)        | $15,75 \pm 1,46^*$        | $4,11 \pm 0,17^*$          | 0,26  |
| 48 годин (n=30)         | $13,54 \pm 1,01^*$        | $4,71 \pm 0,19^*$          | 0,35  |
| 72 години (n=30)        | $11,17 \pm 0,94^*$        | $5,51 \pm 0,16^*$          | 0,50  |
| 168 годин (n=30)        | $16,33 \pm 1,25^*$        | $4,69 \pm 0,14^*$          | 0,29  |
| Інтактні тварини (n=30) | $26,14 \pm 1,03$          | $2,59 \pm 0,05$            | 0,10  |

Примітка. \* – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ).

Через 168 годин після введення чотирхлористого вуглецю (табл. 1) кількість загальних ФЛ дещо підвищувалася, а загального ХС знижалася. Однак, встановленні значення вірогідно відрізнялися від норми. Зміни концентрації загальних ФЛ і ХС відбивалися на показнику співвідношення ХС/ФЛ (див. табл. 1). Так, на 1, 2 і 3 добу розвитку гепатиту коефіцієнт ХС/ФЛ поступово збільшувався, а на 7 добу – набував свого зменшення.

Таким чином, при гострому токсичному гепатиті, спричиненому  $CCl_4$  вміст загальних ФЛ зменшувався більш ніж у 2 рази, а ХС – більш ніж у 2 рази збільшувався. При цьому змінюється їх співвідношення: значення ХС/ФЛ зростало у 5 разів. На 7 добу експерименту кількість загальних ФЛ і

ХС починає поступово відновлюватися.

Також встановлено, що введення  $CCl_4$  призводить не лише до виразного порушення загальних ФЛ, але й до перерозподілу їх окремих фракцій (таблиця 2). Слід відмітити, що динаміка спрямованості кількості фосфоліпідного пулу була різною. Якщо вміст ЛФХ, СФМ і ФС зростав, то вміст ФХ, ФЕА і ФФК, навпроти, зменшувався. До того ж, кратність таких змін була неоднорідною. Так, на третю добу після введення  $CCl_4$  (див. табл. 2) кратність збільшення вмісту ЛФХ складала 1,5, СФМ – 1,2, ФС – лише 1,1 (що відповідало нормі), порівняно з інтактними тваринами. У цей термін вміст ФХ і ФЕА зменшувався в 1,7 разів, а ФФК – в 1,4 разу ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2

Динаміка вмісту фосфоліпідних фракцій у печінці щурів (за ліпідним фосфором, мкг/1г тканини) при токсичному гепатиті, обумовленому  $CCl_4$ , ( $M \pm m$ )

| Показники         | Токсичний гепатит (n=120) |                      |                      |                      | Контрольна група (n=30) |
|-------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
|                   | 24 години (n=30)          | 48 годин (n=30)      | 72 години (n=30)     | 168 годин (n=30)     |                         |
| Загальні ФЛ       | $894,85 \pm 19,21^*$      | $842,40 \pm 17,65^*$ | $748,22 \pm 14,52^*$ | $664,49 \pm 12,26^*$ | $1034,52 \pm 21,73$     |
| ЛФХ               | $103,04 \pm 6,62^*$       | $142,29 \pm 10,34^*$ | $157,31 \pm 10,27^*$ | $147,91 \pm 9,85^*$  | $82,34 \pm 8,12$        |
| СФМ               | $179,61 \pm 12,49$        | $192,48 \pm 13,63^*$ | $211,56 \pm 11,74^*$ | $185,08 \pm 9,65$    | $172,71 \pm 10,25$      |
| ФХ                | $437,02 \pm 16,38^*$      | $339,57 \pm 11,42^*$ | $258,03 \pm 15,25^*$ | $187,16 \pm 10,59^*$ | $520,39 \pm 18,46$      |
| ФЕА               | $130,02 \pm 9,86^*$       | $120,51 \pm 8,24^*$  | $76,62 \pm 7,14^*$   | $87,30 \pm 7,63^*$   | $186,61 \pm 10,78$      |
| ФС                | $23,58 \pm 3,17^*$        | $25,91 \pm 3,56^*$   | $26,72 \pm 4,67$     | $27,17 \pm 3,35$     | $32,44 \pm 2,51$        |
| ФФК               | $28,44 \pm 2,41^*$        | $26,98 \pm 1,89^*$   | $20,23 \pm 1,44^*$   | $30,73 \pm 1,76^*$   | $48,93 \pm 3,19$        |
| ФХ/СФМ            | 2,43                      | 1,80                 | 1,20                 | 1,01                 | 3,01                    |
| ФЕА/ФС            | 5,51                      | 4,65                 | 2,87                 | 3,21                 | 5,75                    |
| ФЕА+ФС/<br>ФХ+СФМ | 0,25                      | 0,27                 | 0,22                 | 0,31                 | 0,32                    |

Примітка. \* – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою тварин ( $p < 0,05$ ).

Отримані дані, на наш погляд, демонструють патогенетичні закономірності токсичного гепатиту, спричиненого чотири хлористим вуглецем. Зменшення вмісту легкоокислювальної фракції ФЛ – ФХ частково може компенсуватися за рахунок збільшення кількості СФМ, що знаходяться, як відомо, у зовнішній частині мембран гепатоцитів.

Нами проведений розрахунок співвідношення ФХ/СФМ (див. табл. 2). Слід зазначити, що у міру прогресування гострого токсичного гепатиту отримані дані зменшувалися. На 3 добу від початку експерименту значення цього співвідношення у дослідній групі тварин складало 1,2, що в 2,5 разу було менше за інтактних щурів. На наш погляд, такі дані свідчать про зменшення рідинних властивостей мембран і збільшення в'язкості ліпідного бішару.

Привертає до себе увагу також зсув рівноваги між вмістом ФЛ фракцій, що характеризують внутрішній моно шар мембран гепатоцитів – ФЕА і ФС. Вміст ФЕА знижався в 1,7 разів, а ФС – не відрізнявся від показників контрольної групи тварин. Також набувало змін значення співвідношення ФЕА/ФС. Найнижчі цифри ФЕА/ФС відзначені на 3 добу після введення  $CCl_4$ : отриманий результат був у 2 рази менше ніж у інтактних щурів ( $p < 0,05$ ).

У ході виконання роботи розраховано коефіцієнт співвідношення ФЛ, що знаходяться у зовніш-

ньому моношарі ліпідного Рішару мембрани гепатоцитів (ФХ і СФМ) і ліпідів внутрішнього моношару (ФЕА та ФС). Використання коефіцієнту  $ФЕА+ФС/ФХ+СФМ$  дозволяє не лише визначити співвідношення ФЛ з меншою насиченістю жирних кислот до ФЛ з більшою насиченістю, але й отримати уявлення про родинність мембран. Як видно з таблиці 2, значення  $ФЕА+ФС/ФХ+СФМ$  набувало свого поступового зменшення. Так, на 3 добу від початку експерименту значення  $ФЕА+ФС/ФХ+СФМ$  складало лише 0,22 у тварин, яким вводили  $CCl_4$  проти 0,32 у контрольній групі. Такий результат свідчить про наявність виразної асиметрії у цьому співвідношенні, що зумовлює підвищення насиченості ліпідного бішару і, відповідно, втрату води мембраною та збільшення її мікрів'язкості.

**Висновки.** В результаті проведених досліджень встановлено, що при токсичному гепатиті, спричиненому чотирихлористим вуглецем, відбуваються зміни складу фосфоліпідів мембран гепатоцитів. Одночасно порушується рівновага їх синтезу та деградації, що призводить до певних морфологічних змін. Враховуючи отримані дані, слід відмітити необхідність включення до комплексної терапії хворих на гострі токсичні гепатити препаратів, які здатні відновлювати спектральний склад фосфоліпідів печінки.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Биологические мембраны: пер. с англ. / под ред. Дж.Б.С. Финдлея, В.Х. Эванза. – М.: Медицина, 1990. – 232 с.
2. Ивашкин В. Т. Диффузные заболевания печени: диагностика и лечение / В. Т. Ивашкин. – М.: Изд. Дом «М-Вести», 2004. – 71 с.
3. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / [В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 62-67.
4. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення / [І.М. Трахтенберг, Н.М. Дитруха, О.С. Моложава, Ю.М. Миرونюк] // Інфекційні хвороби. – 2008. – № 4. – С. 82-89.
5. Скакун Н.П. Поражение печени четыреххлористым углеродом / Н.П. Скакун, Г.Т. Писько, И.П. Мосейчук. – М.: НИИГЭХИМ, 1989. – 107 с.
6. Фосфолипидный состав эритроцитов при неврологических нарушениях у детей; влияние сопутствующей патологии / [Васильев Е.М., Баканов М.И., Гордеев Г.Ф. и др.] // Медицинский науч. и учеб.-метод. журнал. – 2001. – № 2. – С. 92-109.
7. Kaplowitz N. Mechanism of liver cell injury / N. Kaplowitz // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 32 (Suppl. 1). – P. 39-47.
8. Mechanism of Hepatotoxicity / [Jaeschke H., Gores G.S., Cederbaum A.I. et al.] // Toxicological sciences. – 2002. – Vol. 65, № 2. – P. 166-176.

## SUMMARY

### DYNAMICS OF PHOSPHOLIPIDS STATE IN RATS' LIVER AT TOXIC HEPATITIS

**Chaban T.V., Soltuk S.M.**

Experimental researches are carried out on 120 rats-males.  $CCl_4$  was injected intrastomachally once. Phospholipids state of hepatocytes was investigated in 24, 48, 72 and 168 hours after  $CCl_4$  injection. Lower level of general phospholipids, changes of specific parts of phospholipids fractions and higher level of general cholesterol are found in hepatocytes' membranes of experimental animals.

**Key words:** toxic hepatitis,  $CCl_4$ , phospholipids