

УДК 636.09: [615.244 : 577.115]

КОРИГУВАННЯ ЛІПІДНОГО СКЛАДУ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ ЕПІТЕЛІОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ТА ПЕЧІНКИ ЗА ДІЇ КАДМІЮ НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ

В. А. Томчук¹, В. А. Грищенко¹, С. В. Хижняк²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Показано ефективність використання ліпосомальної форми біологічно активної добавки FLP-MD на основі фосфоліпідів молока для відновлення ліпідного та фосфоліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів в умовах дії Кадмію у дозі 1,0 мг/кг маси тіла на організм щурів. Такий ефект дії ліпосомальної форми БАД FLP-MD на досліджувані показники, ймовірно, зумовлений стабілізацією мембранних структур за рахунок подібності ліпідного складу біодобавки з мембранними структурами ссавців та захисту від пероксидного окиснення фосфоліпідів клітинних мембран зважаючи на встановлений нами раніше антиоксидантний ефект дії її компонентів за впливу на організм Кадмію.

Ключові слова: ЛІПІДИ, КАДМІЙ, ВНУТРІШНЯ МЕМБРАНА МІТОХОНДРІЙ, ЕНТЕРОЦИТИ, ГЕПАТОЦИТИ, ФОСФОЛІПІДИ МОЛОКА, ЛІПОСОМИ, ЩУРИ

Антропогенне кадмієве навантаження може індукувати комплекс факторів, які здатні викликати порушення практично на всіх рівнях екосистеми і безпосередньо в організмі людини як її складової частини. Це призводить до виникнення різноманітних патологічних станів не лише внаслідок гострої інтоксикації, але й за умов надходження до організму у відносно низьких концентраціях [1]. При надходженні до організму через шлунково-кишковий тракт, Кадмій переважно всмоктується в тонкій кишці [2]. Процес всмоктування іонів Кадмію в кишечнику характеризується швидким накопиченням його у слизовій оболонці з подальшим повільним надходженням у систему циркуляції [3]. При надходженні Кадмію до порожнини тонкої кишки можуть порушуватись її травні функції. У результаті перорального поглинання, Кадмій абсорбується в кишці, а далі надходить до печінки з портальним кровотоком та інтенсивно поглинається гепатоцитами, впливаючи на їхній структурно-функціональний стан.

Перш за все, токсична дія Кадмію пов'язана з його впливом на структурний стан клітинних мембран. Ефекти, що розвиваються внаслідок цього, можуть бути як специфічними, так і неспецифічними. Внаслідок неспецифічної дії іонів Кадмію може порушуватися структурна цілісність мембран, що призводить до деформації, лізису клітини та її загибелі. Вибіркова дія Кадмію на мембранозв'язані ферменти, транспортні системи, рецепторні комплекси опосередковується переважно через його взаємодію з SH-групами білків.

Вміст ліпідів і їх склад слугують важливою структурно-функціональною характеристикою біомембран будь-яких клітин, у т. ч. епітеліоцитів кишечника та печінки [4]. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив Кадмію на якісні та кількісні характеристики ліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів і можливість їхнього коригування шляхом застосування ліпосом на основі фосфоліпідів (ФЛ) молока.

Матеріали і методи

Дослідження були проведені на безпородних щурах-самцях масою тіла 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин-аналогів розділяли на групи по 10 голів у кожній. У контрольній групі знаходились інтактні тварини; у першій – тваринам упродовж 14 днів перорально вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀; у другій – тваринам перорально вводили 1 %-вий розчин ліпосомальної форми біологічно активної добавки БАД FLP-MD [5] на основі ФЛ молока у дозі 13,5 мг/кг маси тіла упродовж 5 днів, а потім, на тлі застосування біодобавки, вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (впродовж 14 днів). Щурів декапітували після закінчення експерименту під етерним наркозом.

Мітохондрії епітеліоцитів слизової оболонки тонкої кишки (СОТК) і печінки отримували методом диференційного центрифугування, а після заморожування-відтаювання цієї фракції та при подальшому її центрифугуванні при 25 000 g упродовж 30 хв отримували осад, до складу якого входили субмітохондріальні частинки (СМЧ) – обернена назовні внутрішня мембрана мітохондрій [6]. Вміст протеїну в одержаних препаратах визначали методом Лоурі.

Екстракцію ліпідів із зразків внутрішньої мембрани епітеліоцитів проводили за методом I. Folch et al. [7]. Ліпідний спектр досліджували методом тонкошарової хроматографії [8] на стандартних платівках фірми «Сілуфол» (Чехія). Окремі класи ліпідів ідентифікували з використанням маркерів фірм

«Sigma» (США) і «Reanal» (Угорщина). Кількісне визначення індивідуальних ліпідних фракцій здійснювали спектрофотометрично, на спектрофотометрі СФ-46 (Росія).

ФЛ розділяли методом двовимірної тонкошарової хроматографії [9] на стандартних платівках фірми «Сорбфіл» (Росія). Вміст індивідуальних ФЛ визначали за кількістю неорганічного фосфору із застосуванням молібдатного реактиву. Індивідуальні ФЛ ідентифікували за допомогою специфічних реакцій та маркерів, а їхній вміст вимірювали на спектрофотометрі Specol-II фірми «Analytik Jena» (Німеччина) при λ 830 нм.

Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [10]. Зміни показників вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Вивчення ліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій епітеліоцитів СОТК та печінки включало дослідження вмісту загальних ліпідів (ЗЛП), холестеролу (ХС) і загальних фосфоліпідів (ЗФЛ) (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст загальних ліпідів, фосфоліпідів і холестеролу в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів за дії Кадмію та при застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD, $M \pm m$, $n=10$

Група тварин	ЗЛП, мкг/мг протеїну	ЗФЛ, мкг/мг протеїну	ВХС, мкг/мг протеїну	ЕХС, мкг/мг протеїну
<i>Ентероцити тонкої кишки</i>				
Контроль	357,6 ± 20,1	297,9 ± 16,1	38,2 ± 2,4	7,2 ± 0,4
Перша	291,8 ± 19,1*	228,7 ± 17,0*	46,7 ± 3,1*	8,3 ± 0,5*
Друга	397,4 ± 18,5	260,9 ± 15,0	53,2 ± 4,4*	8,6 ± 0,7
<i>Гепатоцити</i>				
Контроль	476,6 ± 40,1	385,6 ± 40,0	31,0 ± 2,4	8,7 ± 0,4
Перша	618,6 ± 60,4*	507,6 ± 49,0*	42,4 ± 3,7*	10,1 ± 0,6*
Друга	538,2 ± 51,1	401,7 ± 30,0	44,7 ± 4,4*	13,1 ± 0,9*

Примітка: ЗЛП – загальні ліпіди, ЗФЛ – загальні фосфоліпіди, ВХС – вільний холестерол, ЕХС – естери холестеролу. * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Результати щодо визначення вмісту ЗЛП і ЗФЛ у досліджуваних препаратах мембран свідчать, що їхній вміст у препаратах СМЧ мембран ентероцитів СОТК знижується на 18,4 і 23,2 % відповідно, а у препаратах СМЧ гепатоцитів зростає на 29,8 і 31,6 % (табл. 1).

Застосування щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на тлі введення Кадмію призводить до відновлення вмісту ЗЛП та ЗФЛ у СМЧ мембран епітеліоцитів СОТК та печінки.

При визначенні вмісту різних фракцій ХС у контрольних препаратах та за дії Кадмію на організм встановлено (табл. 1), що вміст вільного ХС зростає за умов надходження Кадмію на 22 та 35 % для СМЧ мембран ентероцитів і гепатоцитів відповідно. За цих умов збільшується вміст естерів ХС у досліджуваних препаратах СМЧ мембран (у середньому на 15 %). Застосування ліпосомальної форми БАД FLP-MD в умовах надходження Кадмію в організм щурів не призводить до відновлення вмісту вільного ХС та його естерів, за винятком рівня останнього у СМЧ мембран СОТК.

Аналіз результатів представлених у таблиці 2 свідчить про кількісний перерозподіл індивідуальних ФЛ у СМЧ мембран СОТК і печінки за всіх умов експерименту.

Для препаратів СМЧ мембран ентероцитів СОТК за умов надходження Кадмію спостерігається зменшення вмісту основних фракцій ФЛ (ФХ на 32, ФЕ на 36 %), КЛ – на 20 %, сумарної фракції (ФС+ФІ) на 49 і збільшення вмісту СМ на 229 %.

Застосування щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD не призводить до повного відновлення досліджуваних показників, а саме: вміст ФЕ та сумарної фракції (ФС+ФІ) залишається зниженим у препаратах СМЧ мембран ентероцитів СОТК.

Вміст індивідуальних фосфоліпідів (мкг/мг протеїну) у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів за дії Кадмію та при застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD, M ± m, n = 10

Фосфоліпід	Контроль	Перша група	Друга група
<i>Ентероцити слизової оболонки тонкої кишки</i>			
ФХ	126,36 ± 10,91	85,47 ± 8,32*	109,79 ± 10,01
ФЕ	82,84 ± 7,98	53,35 ± 5,01*	56,78 ± 6,91*
СМ	17,83 ± 1,09	40,83 ± 4,20*	38,9 ± 3,21*
ФС+ФІ	25,69 ± 2,21	13,07 ± 1,08*	15,84 ± 4,90*
КЛ	45,09 ± 4,25	35,93 ± 3,21*	39,55 ± 3,07
ЛФХ	–	Сліди	–
ЛФЕ	–	Сліди	Сліди
<i>Гепатоцити</i>			
ФХ	182,44 ± 15,21	205,54 ± 18,09	184,00 ± 15,06
ФЕ	99,94 ± 8,92	138,92 ± 11,44*	102,04 ± 9,80
СМ	18,22 ± 1,22	43,72 ± 4,22*	15,94 ± 1,45
ФС+ФІ	27,08 ± 2,09	32,96 ± 3,06*	34,96 ± 3,07*
КЛ	57,94 ± 5,36	86,46 ± 8,37*	64,76 ± 6,81
ЛФХ	–	Сліди	–
ЛФЕ	–	Сліди	–

Примітка: ФХ – фосфатидилхолін; ФЕ – фосфатидилетаноламін; СМ – сфінгомієлін; ФІ – фосфатидилінозитол; ФС – фосфатидилсерин; КЛ – кардіоліпін; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; ЛФЕ – лізофосфатидилетаноламін. * – $p < 0,05$ відносно контролю.

У препаратах СМЧ мембран гепатоцитів в умовах надходження Кадмію характерним є збільшення вмісту основних фракцій ФЛ та їх міnorних компонентів (табл. 2). Застосування ліпосомальної форми БАД FLP-MD призводить до часткового відновлення вмісту досліджуваних ФЛ у препаратах СМЧ мембран гепатоцитів.

Висновки

Введення інтоксикованим Кадмієм щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі ФЛ молока супроводжується поступовим відновленням ліпідного та ФЛ-складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів при надходженні кадмію хлориду в їхній організм у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀. Такий ефект дії ліпосомальної форми БАД FLP-MD на досліджувані показники, ймовірно, зумовлений стабілізацією мембранних структур за рахунок подібності ліпідного складу біодобавки з мембранними структурами ссавців [5] та захисту від пероксидного окиснення фосфоліпідів клітинних мембран зважаючи на встановлений нами раніше антиоксидантний ефект дії її компонентів за впливу на організм Кадмію [11].

Перспективи подальших досліджень. Зміни ліпідного та фосфоліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів при надходженні кадмію хлориду в організм щурів у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (відповідає 1/50 ЛД₅₀) безперечно будуть впливати на фізичні та структурно-динамічні характеристики цієї мембрани. Тому, на перспективу планується вивчити якісні та кількісні характеристики цих показників і можливість коригування їхніх змін шляхом використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі ФЛ молока.

*V. A. Tomchuk, V. A. Grishchenko, S. V. Khyzhnyak**

CORRECTION OF LIPID COMPOSITION OF MITOCHONDRIAL INTERNAL MEMBRANE IN EPITHELIOCYTES OF SMALL INTESTINE AND IN HEPATOCYTES UNDER CADMIUM EFFECT ON THE RAT ORGANISM

S u m m a r y

Lipid content and composition are very important structural and functional characteristic of bio-membrane in any cells including epitheliocytes of small intestine and hepatocytes. It has been shown the effectiveness of biological active additive FLP-MD use on base of milk phospholipids for recovery of lipid and phospholipid composition of internal membrane of mitochondria in epitheliocytes of mucosal shell of small intestine and in hepatocytes under Cadmium effect in dose of 1 mg per kg of living body weight on organism of

rat. The effect of liposomal form of biological active additive FLP-MD on experimental indexes is probably caused by stabilization of structural elements of membrane in mammals because of similarity of lipid composition of bio-additive with previous ones and because of defense for peroxide oxidation of phospholipids of cellular membranes taking into account the contra-oxidative effect of influence of its components under Cadmium effect on organism.

Томчук В. А., Грищенко В. А., Хижняк С. В.

КОРРЕКТИРОВАНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА И ПЕЧЕНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАДМИЯ НА ОРГАНИЗМ КРЫС

А н н о т а ц и я

Показана эффективность применения липосомальной формы биологически активной добавки FLP-MD на основе фосфолипидов молока для восстановления липидного и фосфолипидного состава внутренней мембраны митохондрий энтероцитов слизистой оболочки тонкого кишечника и гепатоцитов под действием Кадмия в дозе 1,0 мг/кг массы тела на организм крыс. Такой эффект действия липосомальной формы БАД FLP-MD на исследуемые показатели, вероятно, обусловлен стабилизацией мембранных структур за счет схожести липидного состава биодобавки с мембранными структурами млекопитающих и защиты от перикисного окисления фосфолипидов клеточных мембран с учетом установленного нами ранее антиоксидантного эффекта действия её компонентов под действием на организм Кадмия.

1. Михалева Л. М. Кадмийзависимая патология человека / Л. М. Михалева // Архив патологии. – 1988. – № 9. – С. 81–85.
2. Хижняк С. В. Клітинні механізми токсичності кадмію / С. В. Хижняк. – К.: Видавництво «LAT & K», 2010. – 213 с.
3. Elsenhans B. Small intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein / B. Elsenhans, G. J. Strugala, S. G. Schafer [et al.] // Human Exp. Toxicol. – 1997. – V.16. – P.429–434.
4. Грищенко В. А. Ліпідний склад мембран гепатоцитів шурів при медикаментозному гепатиті та застосуванні засобів корегувальної терапії / В. А. Грищенко, О. М. Литвиненко // Вісник БДАУ – 2009. – Вип. 60, Ч. 1. – С. 41–44
5. Пат. 86516 Україна, МПК А 61К 35/20 А 23К 1/00. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Литвиненко О. М.; заявник і патентовласник НУБіП України. – № а200710252; заявл. 14.09.2007; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.
6. Северин Н. В. Практикум по биохимии / Под ред. Н. В. Северина, Л. Н. Соловьева – М. : Из-во МГУ, 1989. – 389 с.
7. Folch J. A rapid method for isolation and purification from animal tissues total lipid / J. Folch, M. Lees, C. Sloane-Stanley // J. Biosci. Rep. – 1984. – № 7. – P. 581–587.
8. Петровский В. И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови / В. И. Петровский, Т. И. Регеранд, Е. И. Лизенко // Лабор. дело. – 1986. – № 6. – С. 339–341.
9. Vaskovsky V. E. A universal reagent for phospholipids analysis / V. E. Vaskovsky // J. Chromatogr. – 1975. – 114, № 1. – P. 123–141.
10. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк., В. М. Войціцький. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 412 с.
11. Хижняк С. В. Функціонування антиоксидантної системи шурів за дії кадмію / Хижняк С. В., Прохорова В. А., Грищенко В. А. [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4. – С. 105–111.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення овець і вовноутворення, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.