

В нашем эксперименте хроническое потребление этанола существенно повышает в сыворотке крови крыс содержание провоспалительных цитокинов, TNF α , интерлейкина-6, а также адипокина, лептина, что свидетельствует о воспалительных процессах в печени. Полученные нами результаты свидетельствуют, что гепатопротекторная эффективность антоцианов капусты краснокочанной была дозозависимой и введение этой субстанции в высокой дозе (22 мг/кг) уверенно снижало аккумуляцию нейтральных липидов в печени животных с токсическим поражением печени, о чём свидетельствуют данные по оценке площади суданофильной окраски и содержанию триглицеридов в печени, а также проявляло выраженное противовоспалительное действие, оцениваемое по снижению уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, уменьшению активности ферментов – маркеров поражения печени, и подтверждаемое результатами гистологических исследований. Введение животным антоцианов снижало дозозависимо содержание факторов TNF α и IL-6, концентрацию лептина и TGF β в сыворотке крови. Полученные результаты позволяют рекомендовать для дальнейших доклинических исследований комплекс антоцианов капусты краснокочанной в качестве эффективного гепатопротектора. Подобным образом, мы оценили гепатопротекторный потенциал экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы (экстракт полифенолов экзокарпия плодов *Vaccinium macrocarpon*) и их комплексов с циклодекстрином при токсическом поражении печени у крыс [5].

Мы предполагаем, что благоприятные гепатопротекторные эффекты исследуемых биологически активных соединений растительного происхождения и их наноструктурированных комплексов опосредованы предотвращением нарушений структуры и функции печени, в первую очередь, митохондрий печени при токсическом поражении, что, в свою очередь, можно объяснить антиоксидантной, противовоспалительной, регуляторной активностью соединений, их мембраностабилизирующим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nna, V.U. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride-induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats / V.U. Nna, U.Z. Usman, E.O. Ofutet, D.U. Owu // Food Chem. Toxicol. – 2017. – Vol. 102. – P. 143 – 155.
2. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder / I. O. Vedenskaya [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – Vol. 52. – P. 188–195.
3. Moskaug, J. Polyphenols and glutathione synthesis regulation / J. Moskaug, H. Carlsen, M.C. Myhrstad, R. Blomhoff // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 81. – P. 277 – 283.
4. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study / C. Jullian [et al.] // Spectrochimica Acta. Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2007. – Vol. 67. – P. 230–234.
5. Cheshchevik, V.T. Rat liver mitochondrial damage under acute or chronic carbon tetrachloride-induced intoxication: Protection by melatonin and cranberry flavonoids / V.T. Cheshchevik, E.A. Lapshina, I.K. Dremza, S.V. Zabrodskaya, R.J. Reiter, N.I. Prokopchik, I.B. Zavodnik // Toxicol. Appl. Pharm. – 2012. – Vol. 261. – P. 271–279.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ

INFLUENCE OF SUCCINIC ACID DERIVATIVES ON LYMPHOCYTE MEMBRANES

Ю. А. Изепченко, И. В. Пухтеева, М. Л. Левин, Н. В. Герасимович
U. Izepchenko, I. Puhteeva, M. Levin, N. Gerasimovich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
julia7521104@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В работе установлено, что после применения препарата янтарной кислоты отмечается уменьшение величины полярности липидного бислоя, в области аннулярного липида между аналогичными показателями не было установлено достоверных различий. При этом отмечалось значительное уменьшение показателей микровязкости аннулярного липида, а показатели микровязкости липидного бислоя выросли в 2,7 раза по сравнению с контрольным значением.

It was found that after the use of the preparation of succinic acid, a decrease in the polarity of the lipid bilayer was noted, but in the region of the annular lipid, no significant differences were found between similar indicators. At the same time, a significant decrease in the microviscosity of the annular lipid was noted, and the microviscosity of the lipid bilayer increased 2.7 times compared with the control value.

Ключевые слова: янтарная кислота, мембраны лимфоцитов, аннулярный липид, липидный бислой, микровязкость мембран, полярность мембран.

Keywords: succinic acid, lymphocyte membranes, annular lipid, lipid bilayer, microviscosity of membranes, membrane polarity.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-258-261>

Янтарная кислота является универсальным промежуточным продуктом обмена. Она образуется в результате цикла трикарбоновых кислот, куда попадают двууглеродные молекулы ацетила из углеводов, липидов и белков. Данная кислота способна усилить клеточное дыхание и транспорт ионов через клеточную стенку, а также стабилизировать белковый обмен.

Препараты янтарных кислот обладают высокой реакционной способностью благодаря влиянию карбоксильных групп. При этом в медицине данное вещество применяется в основном в качестве метаболического средства, которое улучшает метаболизм и энергообеспечение тканей, тем самым уменьшая гипоксию тканей [1]. Производные янтарной кислоты, в частности, соли используются при лечении и профилактике ряда заболеваний. Преимуществом является то, что препараты на основе янтарной кислоты и ее производных более выражено оказывают эффект при патологических состояниях – происходит оптимизация работы всего организма. Чаще всего производные янтарной кислоты используются при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, так как соли янтарной кислоты предотвращают потерю кальция клетками. В неврологии одним из перспективных путей улучшения энергетического обмена нейронов и клеток глии в условиях гипоксии считается стимуляция метаболической цепи цикла Кребса. Одним из способов достижения такого эффекта является использование сукцинатсодержащих препаратов. Помимо антигипоксического и антиоксидантного эффектов, препараты янтарной кислоты оказывают ноотропное и противосудорожное действие. Препараты данной группы модулируют активность ферментов клеточных мембран (Ca^{2+} – независимой фосфодиэстеразы, аденилатциклазы, ацетилхолинэстеразы), рецепторных комплексов (бензодиазепинового, ГАМК, ацетилхолинового), способствуя их связыванию с лигандами, сохранению структурно-функциональной организации биомембран, транспорта нейромедиаторов и улучшению синаптической передачи; повышают концентрацию в головном мозге дофамина, усиливают компенсаторную активацию аэробного гликолиза [1].

Ключевую роль в работе всех внутриклеточных процессов играют структурно-функциональные свойства биомембран, такие как текучесть, проницаемость, полярность и микровязкость мембран.

Биологические мембраны в первую очередь реагируют на внешние воздействия на клетку. Различные модификации структур и свойств клетки лежат в основе нарушения нормальной жизнедеятельности клетки и, как следствие, в развитии патологий. Кроме того, биологическая активность большей части химических соединений обусловлена в большинстве своем мембранными механизмами, которые влияют и на проницаемость мембран, и на их самообновление, и на работу ферментов, связанных с мембранами.

В связи с вышесказанным, цель работы заключалась в проведении анализа влияния производных янтарной кислоты на физико-химические характеристики мембран лимфоцитов периферической крови доноров.

Объектом исследования являлись лимфоциты периферической крови человека. В исследование была включена группа лиц из 15 человек. Забор крови для исследований производили натощак после 12-часового голодания в одно и то же время суток (утром) пункцией локтевой вены (самотеком). Лимфоциты выделяли согласно стандартной методике [2].

Для оценки влияния производных янтарной кислоты на структурное состояние мембран лимфоцитов периферической крови доноров был использован флуоресцентный зонд пирен («Sigma»). Это гидрофобный флуоресцентный зонд, способный встраиваться преимущественно в неполярные области между жирнокислотными цепями фосфолипидов бислоя мембран [3]. В возбужденном состоянии (после поглощения фотона) молекулы пирена сталкиваются с невозбужденными молекулами, объединяясь в долгоживущие комплексы – эксимеры (димеры, состоящие из одной возбужденной и одной невозбужденной молекулы зонда), испускание квантов у которых смещено в более длинноволновую область по сравнению с мономером.

Внедрение зонда осуществлялось, как описано в работе [3], путем прединкубации его спиртового раствора (4 ммоль/л) с клетками ($1 \cdot 10^6$ кл/мл), находящимися в фосфатном буфере (рН 7,4). Конечная концентрация зонда в среде инкубации составляла 5 мкмоль/л. Микровязкость липидного окружения пирена оценивалась по отношению интенсивностей эксимерной и мономерной флуоресценции ($J_{\text{э}}/J_{\text{м}}$) при длинах волн возбуждения 286 и 337 нм.

При помощи флуоресцентного зонда пирена проводилось исследование физико-химического состояния плазматической мембраны лимфоцитов доноров. Из полученных спектров рассчитываются величины микровязкости, полярности липидного компонента мембран и степени тушения белковой флуоресценции.

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2016.

Янтарная кислота является одним из самых изученных внутриклеточных метаболитов из участвующих в метаболических процессах организма. Она выступает в качестве субстрата окислительного фосфорилирования в митохондриях, уменьшая концентрацию лактата, пирувата и цитрата, уровень которых увеличивается при гипоксии. Данная кислота используется во многих областях медицины, особенно в кардиологии. Причиной этого является способность сукцината поддерживать энергосинтезирующую способность клеток в условиях гипоксии.

При помощи флуоресцентного зонда пирена исследовалось физико-химическое состояние плазматической мембраны лимфоцитов доноров. В ряде работ показано, что при возбуждении молекул пирена часть его моно-

меров поднимается в полярные области мембраны, в то время как другие – эксимеризуются в зоне жирнокислотных цепей фосфолипидов. На этом основании из полученных спектров рассчитываются величины микровязкости и полярности липидного компонента мембран клеток [3].

В первой серии экспериментов проводились исследования структурно-функционального состояния липидного компонента мембран указанных клеток. Как видно из данных, представленных в таблице 1, имеет место различие в величине показателей полярности. Этот показатель в области аннулярного липида на 38,6% ниже по сравнению с характеристикой такого показателя в области липидного бислоя.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики структурного состояния липидного компонента мембран лимфоцитов периферической крови доноров (отн.ед.)

Показатель	Аннулярный липид	Липидный бислой
Полярность	0,83±0,05	1,15±0,03
Микровязкость	0,40±0,2	0,22±0,05

Аннулярные липиды составляют пограничный слой липидных молекул, подвижность которых ограничена. Установлено, что их состояние влияет на функциональное состояние мембраносвязанных белков, причем наибольшая активность белков проявляется в менее вязком липидном окружении. Аннулярные липиды отличаются от липидного бислоя не только подвижностью, но и своим поведением. Белковые молекулы ограничивают подвижность прилипающих к их поверхности липидов, в итоге аннулярный слой оказывается более упорядоченным [4].

Полярность, по-видимому, связана с односторонней проницаемостью клеточных мембран. Так, внешняя сторона плазматической мембраны несет положительный заряд, а внутренняя – отрицательный, так как полярные головки обращены в сторону водной фазы и образуют между ними гидрофобную область. Показано, что полярны все мембраны клеток, так как существует различие в составах внутреннего и внешнего по отношению к цитоплазме слоев.

При исследовании показателей микровязкости мембран лимфоцитов доноров, как видно из данных, представленных в табл.1, имеет место различие значений данного показателя в разных областях мембраны. В случае аннулярного липида значение микровязкости почти в 2 раза выше показателя микровязкости липидного бислоя.

Микровязкость также отвечает за регуляцию внутриклеточных процессов. Это показатель, который отражает состояние липидной составляющей мембран, во многом определяет их структуру и диффузные функции. Установлено, что мембраны клеток легко реагируют на метаболические изменения и внешние воздействия [4].

В работе был проведен анализ влияния препаратов производных янтарной кислоты на структурные характеристики мембран лимфоцитов доноров.

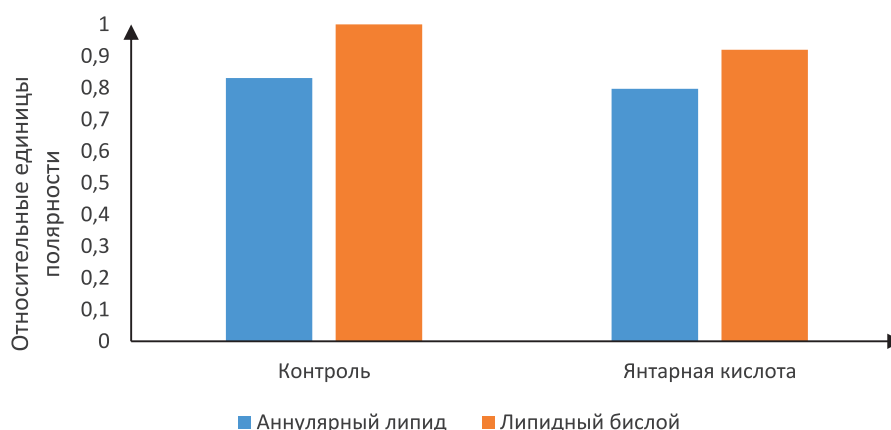


Рис. 1 – Сравнительный анализ влияния янтарной кислоты на показатели полярности лимфоцитов доноров

Как видно из рисунка 1, разница между значениями полярностей аннулярного липида до и после применения препарата не была значимой и составила 3,6% (0,83±0,05 в контроле и 0,80±0,04 после воздействия).

Было обнаружено уменьшение значения полярности липидного бислоя после применения препарата и составило 20% по сравнению со значениями в контроле (1,15±0,03) и 0,92±0,02 после воздействия.

Таким образом, согласно полученным данным можно заключить, что препарат на основе янтарной кислоты вызвал значимое уменьшение показателя полярности липидного бислоя.

Липиды определяют одно из важнейших свойств мембран – текучесть, которая зависит от соотношения холестерина и фосфолипидов. Избыток холестерина повышает микровязкость липидного бислоя, влияет на функциональное состояние клеток, что проявляется и в изменении активности их ферментов, например, снижает активность Na-K-АТФаз [4]. Количество холестерина в мембранах связано с уровнем в плазме крови липопротеидов, причем липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) экстрагируют холестерин из мембран, а липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП) способствуют его внедрению в мембраны [4]. Например, при генерализованной

гнойно-хирургической инфекции концентрации холестерина, ЛПВП, апопротеинов А и В в сыворотке снижаются. Это способствует накоплению холестерина в лимфоцитах, увеличению микровязкости липидного бислоя мембран [4] и ограничению реакции клеток на внешний сигнал [4, 5].

Согласно современным представлениям, большая часть мембранных фосфолипидов и гликолипидов представлена в виде бислоя. Он играет роль растворителя для интегральных белков мембраны и при этом является барьером проницаемости [4].

Анализ показателей микровязкости липидного компонента показал (рисунок 2), что после использования препарата на основе производных янтарной кислоты наблюдалось значительное уменьшение показателя микровязкости в области аннулярного липида, которое составило 35% (при значениях микровязкости в контроле $0,40 \pm 0,2$ и после воздействия – $0,26 \pm 0,3$).

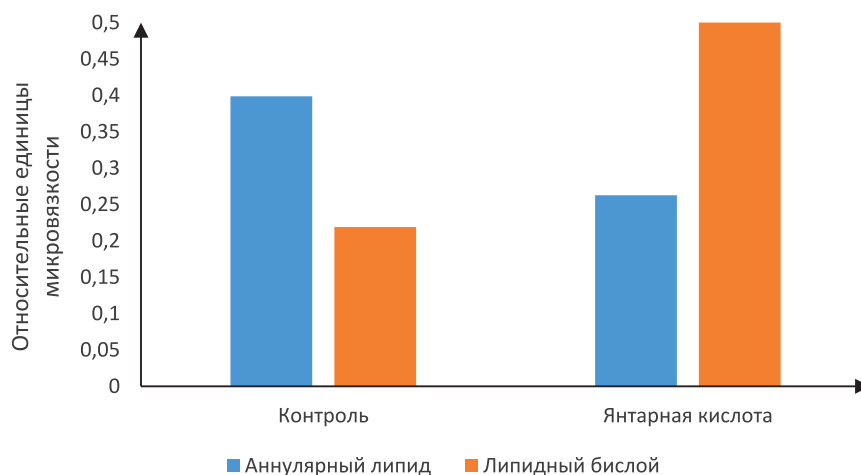


Рис. 2 – Сравнительный анализ влияния янтарной кислоты на показатели микровязкости лимфоцитов доноров (отн. ед.)

При этом показатели микровязкости липидного бислоя выросли в 2,7 раза по сравнению с контрольным значением микровязкости, равным $0,22 \pm 0,05$.

На основании полученных данных можно заключить, что препарат на основе янтарной кислоты по-разному влияет на показатели микровязкости липидного компонента, вызывая уменьшение микровязкости аннулярного липида и увеличение микровязкости липидного слоя.

Можно предположить, что установленные изменения физико-химического состояния липидного компонента мембран лимфоцитов, а особенно показателей микровязкости, могут сказаться и на состоянии их белкового компонента, что должно отразиться на спектральных характеристиках их триптофановых остатков. В связи с этим был проведен анализ степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном у исследуемых групп пациентов. Анализ данного показателя не обнаружил достоверных изменений после воздействия на организм препаратов янтарной кислоты. В контроле этот показатель составил $21 \pm 3\%$, а в экспериментальной группе $24 \pm 5\%$.

Предполагается, что обнаруженное увеличение микровязкости липидного бислоя говорит о влиянии препарата на основе янтарной кислоты на метаболизм лимфоцитов.

Таким образом, препарат на основе производных янтарной кислоты, учитывая его влияние на показатели микровязкости и полярности биомембран, может использоваться в качестве средства, ускоряющего метаболические реакции в организме, и оказывать положительный эффект при лечении ряда патологических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитина, Е. В. Янтарная кислота и ее соли как индивидуальные антиоксиданты и генопротекторы / Е.В. Никитина. – Москва, 2018. – С. 375–376.
2. Клаус Дж. (ред.). Лимфоциты: Методы. / Пер. с англ. – Москва: Мир, 1990. 400 с.
3. Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – Москва: Наука. 1989. 270 с.
4. Болдырев, А. А. Введение в биомембранологию: учебное пособие / Под ред. А.А. Болдырева. – Москва: Издательство МГУ. 1990. 208 с.
5. Лапшина, Е. А. Структурные изменения эритроцитарных мембран в присутствии свободных жирных кислот и их производных / Е.А. Лапшина, И.Б. Заводник // Биологические мембраны. 1995;12:2:157–163.