

УДК 577.115 : 577.115.3 : 612.35

Т. М. ГОРІДЬКО¹, Н. М. ГУЛА¹, В. М. МАРГІТИЧ¹, Н. М. ГОВСЕЄВА¹,
В. М. КЛІМАШЕВСЬКИЙ¹, М. Ю. ШАГІДУЛІН²**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ N-ПАЛЬМІТОІЛЕТАНОЛАМІНУ НА СКЛАД
ФОСФОЛІПІДІВ ТА ЖИРНИХ КИСЛОТ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ІШЕМІЇ**

Изучено влияние N-пальмитоилэтанолamina (NPE, 10^{-5} M) на процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ), состав фосфолипидов и жирных кислот печени крыс при перфузии и ишемии, которые соответствуют разным этапам получения и сохранения донорского органа. Установлено, что уже 5-й минуте перфузии охлажденным консервирующим раствором происходит активация ПОЛ, увеличивается содержание лизофосфатидилхолина (LPC), фосфатидилсерина, снижается уровень общего холестерина. Установлено перераспределение количества насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Добавление NPE в раствор "Евроколлинз" уменьшает накопление малонового диальдегида и LPC, модифицирует содержание жирных кислот. Эти эффекты, по-видимому, лежат в основе протекторного действия NPE на ткани печени в условиях аноксии.

К л ю ч е в ы е с л о в а: N-пальмитоилэтаноламин, фосфолипиды, жирные кислоты, пероксидное окисление липидов, печень, ишемия.

N-ацилетаноламіни (NAE) належать до нового класу біорегуляторів з широким спектром біологічної та фармакологічної дії. З 50-х років було відомо про їх антизапальну, антиоксидантну та деякі інші фармакологічні властивості [1]. Згодом було встановлено значне накопичення цих речовин за ішемії [2,3] та інших патологічних станів [4,5]. Було висловлено припущення, що NAE можуть виявляти мембранопротекторні властивості і синтезуються тканиною для зменшення ступеня ішемічних ушкоджень [2]. Було доведено, що NAE здатні підвищувати щільність мембран [6,7], інгібувати збільшення неспецифічної проникності внутрішніх мембран мітохондрій для іонів Ca^{2+} , що викликана Ca^{2+} -рилізінг агентами, гальмувати розвиток мембранного потенціалу [8]. Нещодавно нами було показано, що в умовах гіпоксії NAE істотно пригнічують вільнорадикальне окислення ліпідів у мітохондріях печінки щурів [9].

Відомо, що ішемія супроводжує всі етапи отримання та зберігання донорського органа. Вона пов'язана з частковим або повним припиненням постачання органа кров'ю. Це призводить до сплеску процесів вільнорадикального окислення ліпідів з наступними функціональними, метаболічними та структурними змінами, які викликають загибель клітин органа [10]. Вважається, що основною причиною необоротних змін в ушкоджених тканинах є прогресуючі порушення структури та функцій мембран клітин. Саме фосфоліпіди є структурними компонентами мембран і важливими біорегуляторами [11–13]. Окрім того, фосфоліпіди та жирні кислоти відіграють значну роль в адаптаційних реакціях організму, регулюю-

ючи рідинність та проникність мембран клітин [14,15].

З огляду на наведене вище, метою нашої роботи було вивчення дії N-пальмітоїлетаноламіну (NAE 16 : 0) на процеси пероксидного окислення ліпідів та склад фосфоліпідів і жирних кислот консервованої печінки щурів.

Матеріали і методи

Робота проводилася на 30 щурах-самцях вагою 250–300 г. Перфузію печінки проводили *situ* згідно з методом Kamada [16] охолодженою консервуючим розчином "Евроколлінз" ("Eurocollins", ЕС) (в ммоль/л: бікарбонат – 10; хлорид – 15; фосфат – 57,5; натрій – 10; калій – 115 на 500 мл дистильованої води. Перед використанням додавали 50 мл 40%-ї глюкози). Через 5 хв перфузію припиняли, а печінку зберігали протягом 22 год при 4 °С у консервуючій середовищі ЕС. Через 2, 4, 6 та 22 год забирали проби тканини для досліджень, які зразу заморожували у скрапленій азот.

Тварин було поділено на 7 груп: I – інтактний контроль; II та III – тварини, печінку яких піддавали 5-хвилинній перфузії розчинами I та ЕС + NAE 16 : 0 (10^{-5} M) з одночасним охолодженням; IV та V – тварини, печінку яких зберігали 6 год у розчинах ЕС та ЕС+NAE; VI та VII – тварини, печінку яких зберігали 22 год у розчинах ЕС та ЕС+NAE.

Екстракцію ліпідів проводили за методом Bligh і Dyer [17]. Одержані екстракти очищали від неліпідних домішок за методом Кейтса [18]. Розділення фосфоліпідів проводили за допомогою двовимірної мікротонкошарової хромато-

графії за методом Svetashev і Vaskovsky [19]. Фосфоліпідні класи ідентифікували як описано нами раніше [20]. Вміст фосфоліпідів у ліпідних екстрактах виражали через кількість в них неорганічного фосфору [21].

Кількісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили за допомогою газо-рідинної хроматографії на хроматографі Carlo Erba (Італія) з полум'яно-йонізаційним детектором на скляній колонці (довжина 2,5 м, внутрішній діаметр 3 мм), яка була заповнена 10%-ю фазою Sp 2300 (Silar 5С) на «Chromosorb W/HP» при програмуванні температури 140–250 °С (2 °С/хв).

Кількісне визначення холестеролу проводили на хроматографі Chrom-5 (Чехія) з дуальною системою на колонці з нержавіючої сталі 0,5 м, яку було заповнено Chimalite W (80–100 mesh), та просичено 1,5%-ю рідкою фазою OV-1 («Shimadzu», Japan) при температурі інжектора 250 °С та детектора – 270 °С і запрограмуванні температурі 180–250 °С (10 °С/хв).

Визначення інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів проводили згідно з методом накопичення ТБК-активних продуктів (МДА), як описано в роботах [22,23].

Статистичний аналіз проводили з використанням t-критерію Стьюдента, вірогідними вважали дані при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

На рис. 1 представлено дані щодо впливу NAE на вміст малонового діальдегіду (МДА) в аноксичній печінці щурів за перфузії та ішемії. Як видно з рисунка, у разі 5-хвилинної перфузії охолодженим розчином ЕС має місце вірогідне

зростання рівня МДА. За 22 години ішемії цей показник збільшується у 2 рази. Додавання до консервуючого розчину NAE запобігає накопиченню МДА під час перфузії, але не впливає на цей показник за ішемії.

Дослідження вмісту загальних фосфоліпідів та холестеролу печінки щурів за перфузії та ішемії показало, що у разі 5-хвилинної перфузії охолодженим розчином ЕС рівень загальних фосфоліпідів не змінюється, але відбувається вірогідне зменшення вмісту загального холестеролу (табл. 1). Спостерігається тенденція до зменшення співвідношення холестерол/фосфоліпід ($t=2,05$). За ішемії різної тривалості не відмічено змін рівня загальних фосфоліпідів, але вірогідним є падіння на 22-й годині ішемії вмісту загального холестеролу. Додавання NAE до консервуючого розчину запобігає зменшенню рівня холестеролу за перфузії та ішемії аноксичної печінки щурів.

Хоча загальний вміст фосфоліпідів під час перфузії охолодженим розчином ЕС та ішемії не змінюється, індивідуальні фосфоліпідні класи зазнають певних змін (табл. 1). Так, за перфузії збільшується кількість фосфатидилсерину (PS), виявляється тенденція до підвищення рівня лізофосфатидилхоліну (LPC; $t=2,14$). При різних строках ішемії вміст фосфатидилсерину майже не відрізняється від початкових значень, а рівень лізофосфатидилхоліну весь час зростає і досягає максимального значення на 6–22-й годині ішемії (рис. 2). Додавання NAE до розчину ЕС запобігає накопиченню LPC до 6-ї години консервації включно та спричиняє під час перфузії збільшення кількості фосфатидилінозитолу (PI).

В табл. 2 представлено основні показники

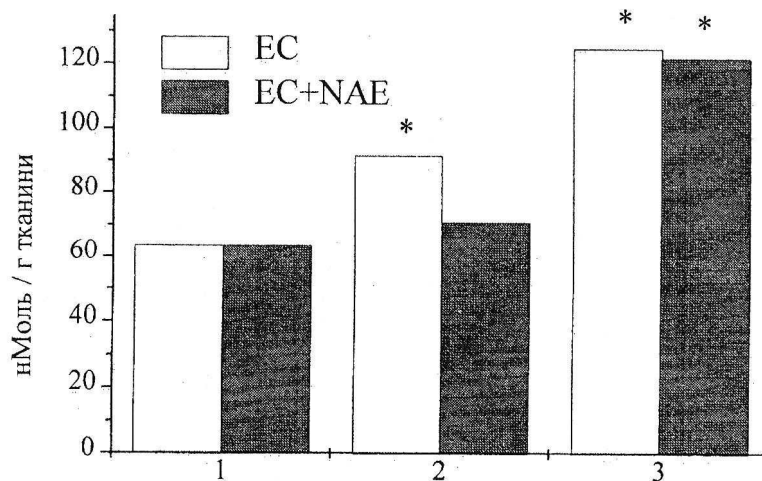


Рис. 1. Вплив NAE на вміст малонового діальдегіду в аноксичній печінці щурів: 1 – інтактний контроль; 2 – 5-хвилинна перфузія; 3 – 22-годинна ішемія; * дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$.

Таблиця 1. Вплив NAE на вміст загальних та індивідуальних фосфоліпідів, а також холестеролу в аноксичній печінці щурів за перфузії та ішемії (% , $M \pm m$) ($n = 4-8$)

Фосфоліпід	Інтактний контроль	5-хвилинна перфузія		6-годинна ішемія		22-годинна ішемія	
		ЕС	ЕС+ NAE	ЕС	ЕС+ NAE	ЕС	ЕС+ NAE
Загальні фосфоліпід, мкг Р/г тканини	715,5±53,1	764,4±23,9	727,3±61,3	724,4±42,9	710,1±66,0	672,8±43,4	651,2±57,4
Загальний холестерол, мг/г тканини	4,9±0,1	4,3±0,1*	6,2±0,8	4,7±0,7	3,4±0,9	4,5±0,1*	5,8±1,0
Холестерол/фосфоліпід, мг/мг	7,2±1,1	4,8±0,4	7,6±1,04	6,9±1,4	5,1±0,9	6,9±1,2	8,0±0,9
Фосфатидилхолін	56,1±0,9	55,3±0,7	54,6±2,7	60,4±2,1	55,3±0,9	54,6±1,2	56,4±0,9
Лізофосфатидилхолін	0,8±0,1	1,1±0,1	0,9±0,3	1,7±0,4 *	1,2±0,2	1,4±0,2 *	1,2±0,1*
Фосфатидилетаноламін	26,1±0,6	26,4±1,2	24,3±1,8	25,1±1,1	27,2±0,4	27,6±0,9	27,4±0,9
Дифосфатидилгліцерол	4,2±0,2	4,2±0,4	4,5±0,4	4,2±0,2	3,8±0,3	4,9±0,4	3,8±0,4
Сфінгомелін	4,8±0,6	3,9±0,3	4,6±0,2	4,7±0,2	4,2±0,4	4,9±0,3	4,7±0,3
Фосфатидилінозитол	4,4±0,2	4,8±0,2	6,5±0,2 *	4,7±0,7	4,4±0,4	4,8±0,3	3,8±0,2
Фосфатидилсерин	1,9±0,1	2,8±0,2 *	2,7±0,2 *	2,1±0,3	2,6±0,6	2,5±0,2	1,7±0,3
Стартова зона	0,7±0,3	0,3±0,1	0,6±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1	0,7±0,2	0,6±0,1

Примітка: *дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$.

жирнокислотного складу аноксичної печінки щурів за перфузії та ішемії. Як видно з таблиці, у разі 5-хвилинної перфузії розчином ЕС, спостерігається зменшення рівня деяких дієнових кислот, зокрема лінолевої кислоти (рис. 3), хоча загальна кількість ненасичених кислот залишається без змін. У разі 6-годинної ішемії показано зростання рівня ненасичених кислот з одночасним зменшенням кількості насичених. Так,

збільшується вміст пальмітолеїнової, ейкозатрієнової кислот. Спостерігається тенденція до збільшення арахідонової кислоти ($t = 2,39$). Падає рівень пентадецилової, арахінової кислот, зменшується вміст пальмітинової кислоти ($t = 2,14$). На 22-й годині ішемії не відбувається змін основних показників жирнокислотного складу, але залишається високим рівень пальмітолеїнової кислоти. Додавання NAE до консервуючого роз-

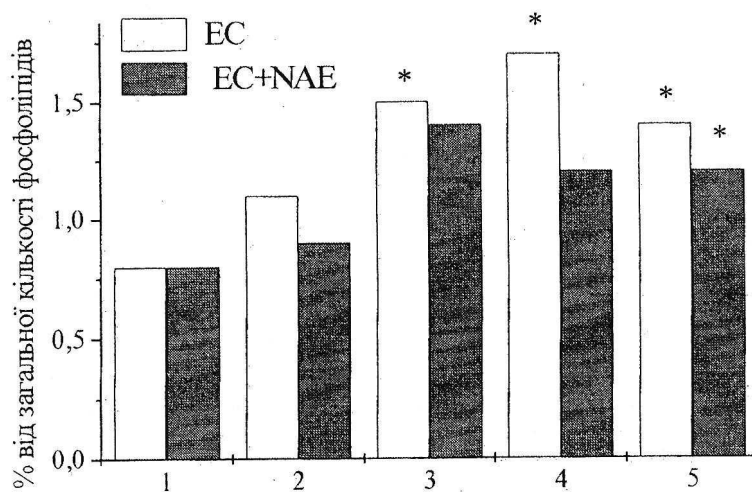


Рис. 2. Вплив NAE на вміст лізофосфатидилхоліну в аноксичній печінці щурів: 1 – інтактний контроль; 2 – 5-хвилинна перфузія; 3 – 4-годинна ішемія; 4 – 6-годинна ішемія; 5 – 22-годинна ішемія; * дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$.

Таблиця 2. Вплив NAE на основні показники жирнокислотного складу аноксичної печінки щурів за перфузії та ішемії (%), $M \pm m$ ($n = 3$)

Жирні кислоти	Інтактний контроль	5-хвилинна перфузія		6-годинна ішемія		22-годинна ішемія	
		ЕС	ЕС+NAE	ЕС	ЕС+NAE	ЕС	ЕС+NAE
Ненасичені:	55,45±1,19	56,57±1,60	53,26±0,43	61,64±0,69*	57,57±1,03***	53,33±0,99	53,95±0,58
Моноєнові	15,06±0,26	19,78±4,55	14,76±0,76	15,92±0,50	15,97±1,03	15,61±1,30	15,02±0,44
Дієнові	19,82±0,64	16,48±0,20*	19,34±0,18**	18,14±1,53	20,24±0,35	17,85±0,48	20,43±0,64****
Три- та полієнові	20,57±2,09	20,31±2,75	19,15±0,51	27,59±1,35*	21,35±2,41	19,86±0,56	18,50±0,49
Насичені	44,40±1,26	43,09±1,47	46,02±0,37	38,32±0,72*	41,91±0,61***	46,07±1,03	45,32±0,84
Відношення насичені/ненасичені	0,80±0,04	0,76±0,07	0,86±0,01	0,62±0,02*	0,73±0,02***	0,86±0,03	0,84±0,02

Примітка: * дані вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$; ** дані вірогідні по відношенню до перфузії ЕС, $p < 0,05$; *** дані вірогідні по відношенню до 6-годинної ішемії ЕС, $p < 0,05$; **** дані вірогідні по відношенню до 22-годинної ішемії ЕС, $p < 0,05$.

чину не впливає на розподіл насичених та ненасичених жирних кислот (табл. 2), але запобігає зростанню вмісту ейкозатриєнової, арахідонової та зменшенню лінолевої кислот.

Отже, отримані дані свідчать про те, що 5-хвилинна перфузія охолодженим консервуючим розчином ЕС та ішемія впливають на склад фосфоліпідів та жирних кислот печінки щурів. Відбувається активація процесів пероксидного окис-

лення ліпідів, що ми бачимо по накопиченню МДА. Збільшується рівень LPC, зростає вміст ненасичених жирних кислот, зменшується рівень загального холестеролу. Особливо привертає увагу факт накопичення арахідонової та ейкозатриєнової кислот, а також незначне зниження лінолевої кислоти. Відомо, що зміни температури навколишнього середовища впливають на перерозподіл вмісту насичених та ненасичених жирних кислот

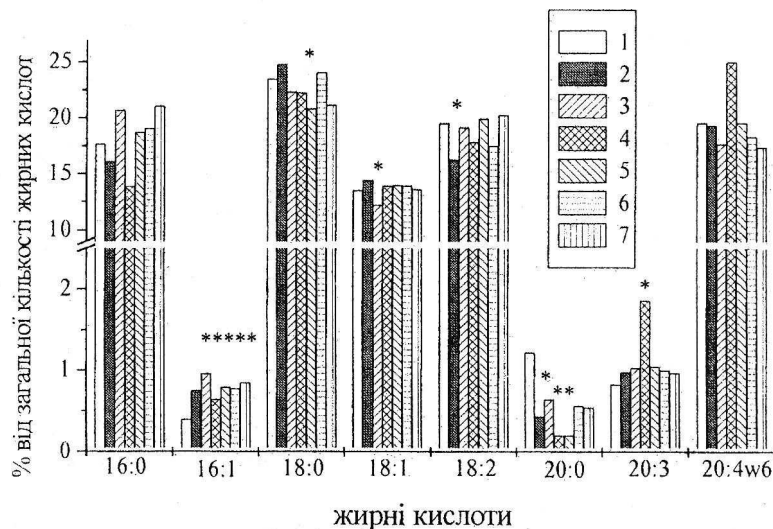


Рис. 3. Вплив NAE на вміст основних жирних кислот в аноксичній печінці щурів: 1 – інтактний контроль; 2 – 5-хвилинна перфузія, ЕС; 3 – 5-хвилинна перфузія, ЕС+NAE; 4 – 6-годинна ішемія, ЕС; 5 – 6-годинна ішемія, ЕС+NAE; 6 – 22-годинна ішемія, ЕС; 7 – 22-годинна ішемія, ЕС+NAE; C16:0 – пальмітинова кислота; C16:1 – пальмітолеїнова кислота; C18:0 – стеаринова кислота; C18:1 – олеїнова кислота; C18:2 – лінолева кислота; C18:3 – ліноленова кислота; C20:0 – арахідова кислота; C20:3 – ейкозатриєнова кислота; C20:4 ω6 – арахідонова кислота; * дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$.

[14]. Тому отримані результати можна розглядати як адаптивні зміни органа до гіпотермічних умов та як прояв ішемії.

Додавання N-пальмітоїлетаноламіну гальмує накопичення МДА, LPC, ейкозатриєнової, арахідонової кислот, стабілізує вміст лінолевої кислоти, підвищує рівень фосфатидилінозиту в аноксічній печінці щурів. Ці ефекти NPE можуть бути основою протекторної дії їх і сприяти мінімізуванню деструктивних змін в ізольованому органі. Так, аналіз морфологічних змін печінки показав, що додавання NPE до консервуючої суміші значно гальмувало розвиток дистрофічних процесів у тканині печінки, починаючи з 6-ї години ішемії, особливо на 22-й годині. Було виявлено певну стабілізацію структури органа, що виявлялось в ущільненні оболонок та цитоплазми клітин, збереженні структури печінкових балок при одночасному зменшенні їх об'єму (персональне повідомлення М. Ю. Шагідуліна).

Таким чином, на основі проведених досліджень встановлено, що N-пальмітоїлетаноламін у разі додавання його до стандартного консервуючого розчину "Євроколлінз", за умов перфузії та ішемії здатен гальмувати процеси пероксидного окислення ліпідів та запобігати пероксидній деструкції фосфоліпідів і жирних кислот печінки щурів.

*T. M. Goridko¹, N. M. Gula¹,
V. M. Margitich¹, N. M. Govseyeva¹,
V. M. Klimashevsky¹, M. Yu. Shagidulin²*

INFLUENCE OF N-PALMITOYL-ETHANOLAMINE ON PHOSPHOLIPID AND FATTY ACID CONTENT IN THE RAT LIVER UNDER ISCHEMIA

S u m m a r y

The effect of N-palmitoylethanolamine (NPE, 10⁻⁵M) on the lipid peroxidation (LPO) processes, phospholipid and fatty acid content in the rat liver at perfusion and ischemia during the liver preservation was estimated. As early as at the 5th min of perfusion by cooled conserving solution "Eurocollins", LPO activation was determined. Simultaneously the content of lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylserine increased, the total cholesterol level decreased. The redistribution of saturated and unsaturated fatty acids quantity was detected. The addition of NPE into "Eurocollins" solution reduced the accumulation of malonaldehyde and LPC, modified the fatty acids content. These effects, evidently, formed the basis of the protective action of NPE on the hepatic tissues under anoxia.

K e y w o r d s: N-palmitoylethanolamine,

phospholipids, fatty acids, lipids peroxidation, liver, ischemia.

¹Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine;
²Institute of Surgery and Transplantology, AMS of Ukraine;
E-mail: ngula@biochem.kiev.ua

1. Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V. // *Prog. Lipid Res.* 1990. **29**. P. 1–43.
2. Epps D. T., Schmid P. C., Natarajan V. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979. **90**, N 2. P. 628–633.
3. Epps D. T., Schmid P. C., Natarajan V. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. **618**. P. 420–430.
4. Hansen H. S., Lauritzen L., Moesgaard B. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1998. **55**, N 6. P. 719–725.
5. Hansen H. S., Moesgaard B., Hansen H. H. et al. // *Lipids.* 1999. **34**. P. 327–330.
6. Domingo J. C., Mora M., Africa de Madariaga M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. **1148**. P. 308–316.
7. Ambrosini A., Bertoli E., Mariani P. et al. // *Ibid.* 1993. **1148**. P. 351–355.
8. Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O. et al. // *J. Biol. Chem.* 1982. **257**. P. 1383–1391.
9. Gulaya N. M., Kuzmenko A. I., Margitich V. M. et al. // *Chem. Phys. Lipids.* 1998. **97**. P. 49–54.
10. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М.: Медицина. 1989. 368 с.
11. Дятловицкая Э. В., Безуглов В. В. // *Биохимия.* 1998. **63**, № 1. С. 3–6.
12. Philip L. Yeagle // *The FASEB Journal.* 1989. **3**. P. 1833–1842.
13. Грибанов Г. А. // *Вопр. мед. хим.* 1991. **37**, № 4. С. 8–15.
14. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 1981. 339 с.
15. *Текучесть мембраны в биологии: Концепции мембран. Структуры / Под ред. Элойа Р. К.* Наук. думка. 1989. 312 с.
16. Kamada N. Experimental transplantation // *CRS Press, INC BOCA RATON, Florida.* 1988. P. 1–17.
17. Bligh E. G., Dyer W. I. // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. **37**, N 8. P. 911–917.
18. Кеймс М. Техника липидологии. М.: Мир. 1975. 322 с.
19. Syetashv V. I., Vaskovsky V. E. // *J. Chromatogr.* 1972. **67**. P. 376–378.

20. Горідько Т. М., Маргітич В. М., Клімашевський В. М. та ін.// Укр. біохім. журн. 1996. **68**, № 2. С. 99–102.
21. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y.// J. Chromatogr. 1972. **67**. P. 376–378.
22. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972. 252 с.
23. Мельничук С. Д., Кузьменко А. И., Маргітич В. М. и др.// Укр. біохім. журн. 1998. **70**, № 1. С. 87–94.

¹Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України;

²Інститут хірургії та трансплантології АМН України;

E-mail: ngula @ biochem.kiev.ua

Одержано 20.04.2000