

ниям, которые происходят в организме при употреблении молочных продуктов.

Полученные в результате проведенных исследований данные указывают, что отсутствие склонности к употреблению молочных продуктов старшеклассниками промышленного города приводит к ухудшению их самочувствия (преморбидным состояниям). Это проявляется, в основном, более частыми жалобами на головную боль, общее недомогание, грусть, раздражительность и неприятные ощущения в области сердца, по сравнению со сверстниками, предпочитающими употребление молочных продуктов.

Эти болезненные явления говорят об отрицательных функциональных изменениях, происходящих в нервной системе (головной боли, общем недомогании, грусти, раздражительности) и сердечно-сосудистой (неприятных ощущениях в области сердца). Указанные функциональные изменения при определенных условиях в дальнейшем могут привести к заболеваниям этих и других систем организма.

Для профилактики ухудшения самочувствия старшеклассников промышленного города следует рекомендовать им употребление ежедневно (по 1-3 раза в сутки) молочных продуктов. Как минимум, необходимо, в соответствии с рекомендациями В.Д. Ванханена и В.В. Ванханена, выпивать за час перед сном по стакану молочного продукта (молока, кефира, простокваши, ряженки).

ЛИТЕРАТУРА

1. Петровский К.С., Ванханен В.Д. Гигиена питания. — М., 1982. — 528 с.
2. Ванханен В.В., Ванханен В.Д. Учение о питании. — Донецк, 2000. — 352 с.
3. Капранов С.В., Капранова Г. В., Тарасова И.О., Безручко Д.Ю., Головина Т.Ю., Догадина Я.А., Наумова Ю.Ю., Несвит М.А., Ковалева О.С., Стрельцова И.В. Анализ жалоб у старшеклассников промышленного города на ухудшение самочувствия // Материалы IV Міжнародної науково-практичної конференції "Динамика наукових досліджень, 2005". 20-30 червня 2005 року. — Дніпропетровськ: Медицина, 2005. — Т. 30. — С. 51-52.

THE EVALUATION OF THE STABILITY OF THE BIOLOGICAL MEMBRANES ON THE EFFECTS OF CROWN-ETHER

Kratenko R.I.

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИ ДЕЙСТВИИ КРАУН-ЭФИРОВ

M

КРАТЕНКО Р.И.

Харьковский государственный медицинский университет

УДК 577.1: 615.9: 614.7: 661.185

ОЦІНКА СТАБІЛЬНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН ПІД ДІЄЮ КРАУН-ЕФІРІВ

Кратенко Р.И.

Вивчено вплив краун-ефірів (12-краун-4, 15-краун-5, 18-краун-6) та псевдо-краун-ефірів (тіо-12-краун-4, тіо-15-краун-5, аза-12-краун-4) на фосфоліпідний склад еритроцитів і гепатоцитів, проникність мембран для K⁺ та інтенсивність біохемілюмінесценції тканин і біологічних рідин. Виявлено підвищення вмісту лізофосфоліпідів у мембранах гепатоцитів та еритроцитів, підвищення проникності еритроцитарних мембран для іонів K⁺, зростання інтенсивності біохемілюмінесценції тканин та біологічних рідин у тварин. Показано залежність між дослідженими показниками, що дає змогу розглядати біохемілюмінесценцію як швидкий та ефективний метод оцінки сталості біологічних мембран.

ногие химические соединения, преимущественно синтезированные в последние годы, мало изучены в отношении их медико-биологических свойств. Это в полной мере относится и к новой группе веществ органического синтеза — классическим краун-эфирам марок 12-краун-4, 18-краун-6, 15-краун-5, а также псевдо-краун-соединениям, таким как тио-12-краун-4, тио-15-краун-5, аза-12-краун-4, содержащим вместо кислорода атомы серы или азота в циклических кольцах своих молекул. Данная группа веществ нашла широкое применение в экстракции, разделении ионов металлов, межфазном катализе, электрохимии, катализе окислительно-восстановительных реакций, электронике, моделировании биохимических процессов [1]. Большие объемы производства и широкое применение макроциклических эфиров в различных отраслях народного хозяйства предполагают значительное воздействие их на здоровье населения [2]. Это определяет актуальность исследований тонких биохимических механизмов влияния этих ксенобиотиков на организм теплокровных животных и человека.

В силу особенностей химического строения, физико-химических свойств и биотрансформации в организме макроциклические эфиры могут оказывать как прямые, так и опосредованные мембранотропные эффекты [2, 3]. Опосредованное влияние изучаемых ксенобиотиков на биологические мембраны реализуется через активацию свободнорадикальных процессов (СРО) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3, 4]. Об этом свидетельствуют полу-

ченными нами данные о накоплении диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в печени и сыворотке крови, снижении восстановленного глутатиона, изменении активности ферментов антиоксидантной защиты у крыс, подвергнутых воздействию краун-эфиров [3, 4].

Целью работы было исследование влияния краун- и псевдо-краун-эфиров на стабильность биологических мембран эритроцитов и гепатоцитов.

Объект и методы исследования. Работа выполнена на белых крысах популяции Вистар, массой 200-220 г. Животным перорально с помощью металлического зонда вводили водные растворы исследуемых соединений. В подостром эксперименте испытана доза 1/100 ДЛ₅₀, что соответствовало составляло для 12-краун-4 — 11,17 мг/кг массы животного; 15-краун-5 — 13,5 мг/кг; 18-краун-6 — 12,7 мг/кг; тио-12-краун-4 — 36,5 мг/кг; тио-15-краун-5 — 48,0 мг/кг; аза-12-краун-4 — 22,0 мг/кг. Длительность внутрижелудочной

3 ДОСВІДУ САНІТАРНОЇ ТА ЛІКУВАЛЬНОЇ ПРАКТИКИ



трифугировании. Для исследования мембран гепатоцитов печени животных гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Мембраны выделяли по общепринятым методам, используя рекомендации Финдлея и Эванса [5].

Экстракцию липидов проводили по методу Кейтса [6]. Для разделения индивидуальных фосфолипидов из фракции использовали двухмерную тонкослойную хроматографию [7]. Количественное содержание общих и индивидуальных фосфолипидов в липидных экстрактах оценивали по количеству неорганического фос-

фора, который определяли с помощью молибденового колориметрированием. Соотношение фосфолипидных фракций рассчитывали в процентах фосфора фосфолипидов каждой фракции к сумме фосфора всех липидов, принятых за 100%.

Для выявления нарушения проницаемости эритроцитарных мембран использовали метод измерения скорости выхода ионов K⁺ с помощью стеклянного селективного электрода 2407 K⁺ в бескальциевую среду. Измерение проницаемости эритроцитарных мембран для ионов K⁺ производилось по двум показателям: скорости самопроизвольного выхода ионов K⁺ в бескальциевую среду и скорости индуцированного специфическим ионофором (валиномицином) выхода ионов K⁺.

Интенсивность биолюминесценции, индуцированной 0,5% раствором перекиси водорода, измеряли на хемилюминометре ХЛМ-Ц1-01, как описано Журавлевым [8]. Оценка результатов осуществлялась по интенсивности и кинетике протекания реакции свечения после добавления индуктента.

Влияние краун- и псевдо-краун-эфиров (1/100 ДЛ₅₀) на фосфолипидный состав мембран гепатоцитов

Вещество	Фракция фосфолипидов, %					
	ФХ	СМ	ЛФЭА	ЛФХ	ФИ	КЛ
Контроль	38±2	16±1	1,5±0,4	1,6±0,5	7,6±0,1	0,60±0,1
12-краун-4	47±1*	11±1*	4,2±0,7*	5,0±0,7*	3,8±0,3*	0,81±0,03*
15-краун-5	45±1*	11±1*	6,5±1,2*	4,6±0,8*	4,5±0,4*	0,78±0,02*
18-краун-6	46±1*	11±1*	5,5±1,1*	5,1±0,7*	4,3±0,6*	0,79±0,03*
Тио-12-краун-4	39±3	10±1*	4,3±0,6*	4,0±0,4*	3,7±0,4*	0,5±0,1
Тио-15-краун-5	42±4	11±1*	4,6±0,5*	4,9±0,3*	3,3±0,6*	0,80±0,25
Аза-12-краун-4	40±3	11±1*	6,2±0,7*	5,2±0,6*	4,4±0,7*	0,6±0,2

Примечание к таблицам 1-5:

* — различия с контролем статистически достоверны.

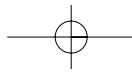
затравки составляла 30 суток. В каждой группе насчитывалось по 15 животных.

Было исследовано влияние данных веществ на фосфолипидный состав мембран эритроцитов и гепатоцитов, проницаемость мембран эритроцитов для K⁺, а также изучена биолюминесценция (БХЛ) тканей и биологических жидкостей.

Для анализа фосфолипидного состава использовались эритроциты крыс, отмытые от плазмы раствором хлористого натрия при 3-4-кратном цен-

Влияние краун- и псевдо-краун-эфиров (1/100 ДЛ₅₀) на фосфолипидный состав мембран эритроцитов

Вещество	Фракция фосфолипидов, %				
	ФЭ	ФХ	СМ	ФС	ЛФХ
Контроль	22±2	44±1	12±1	12±1	3,5±0,6
12-краун-4	22±2	49±1*	18±1*	8±1*	7,4±0,5*
15-краун-5	23±1	48±1*	15±1*	9±1*	7,6±0,4*
18-краун-6	22±2	47±1*	17±1*	9±1*	6,5±0,3*
Тио-12-краун-4	21±1	47±2	18±1*	9±2	6,8±0,6*
Тио-15-краун-5	22±2	48±2	17±2*	10±2	7,3±0,7*
Аза-12-краун-4	24±2	48±4	17±2*	11±2	6,2±0,6*



Статистическая обработка результатов проведена по Стьюденту-Фишеру [9].

Результаты исследования. Цифровые данные, приведенные в таблицах 1 и 2, свидетельствуют о более существенном влиянии класси-

ношение СМ и ФС в мембранах гепатоцитов и эритроцитов существенно отличалось. Так, в отличие от мембран гепатоцитов, в эритроцитах все три представителя краун-эфиров снижали процентное содержание ФС, а процентное содержание СМ под влиянием этих веществ в эритроцитах достоверно повышалось. Эти отличия, возможно, связаны с ролью печени как в обмене липидов вообще, так и в обмене фосфолипидов в частности [10]. Биосинтез фосфолипидов в печени необходим не только для обеспечения обновления и приспособления структурных фосфолипидов в мембранных элементах гепатоцитов, но и

гепатоцитов и эритроцитов под влиянием двух групп исследуемых веществ было практически одинаковым.

Обнаруженные изменения в фосфолипидном составе эритроцитов и гепатоцитов (в частности, накопление ЛФХ и ЛФЭА) свидетельствуют о снижении стабильности биологических мембран под влиянием данных ксенобиотиков. Прямым подтверждением нарушения проницаемости мембран под воздействием макроциклических эфиров служат результаты экспериментов по изучению их влияния на скорость выхода ионов K^+ из эритроцитов.

Все исследованные краун-эфиры существенно (в 12-15 раз) повышали свободный и на 40-86% — индуцированный валиномицином выход K^+ из эритроцитов (табл. 3). Антибиотик валиномицин является ионофором, специфически связывающим ионы K^+ , тем самым способствуя его транспорту через биологические мембраны. Способность валиномицина транспортировать ионы K^+ через мембраны связана с его липофильной природой. Изменения в фосфолипидном составе мембран эритроцитов, очевидно, облегчают роль валиномицина в качестве переносчика ионов K^+ . Действие представителей псевдо-краун-эфиров на выход K^+ из эритроцитов было менее выраженным.

Повышение процентного содержания лизоформ фосфолипидов, нарушение проницаемости мембран, очевидно, является следствием активации ПОЛ [3, 8, 12]. Это подтверждается и результатами по БХЛ тканей и биологических жидкостей. БХЛ биосубстратов и биологических жидкостей характеризует, в первую очередь, интенсив-

Таблица 3

Влияние краун-эфиров (1/100 ДЛ₅₀) на проницаемость мембран эритроцитов для K^+ (мкмоль K^+ /мин. · 10⁶ эритроц.)

Вещество	Свободный выход K^+	Выход, индуцированный валиномицином
Контроль	0,100±0,008	6,15±0,26
12-краун-4	1,53±0,04*	10,47±0,35*
15-краун-5	1,44±0,03*	11,15±0,37*
18-краун-6	1,260±0,025*	9,72±0,43*

ческих краун-эфиров на фосфолипидный состав эритроцитов и гепатоцитов, по сравнению с тио- и аза-соединениями. Так, в гепатоцитах (табл. 1) 12-краун-4, 15-краун-5 и 18-краун-6 повышали процентное содержание фосфатидилхолина (ФХ) и кардиолипина (КЛ), снижая при этом процентное содержание фосфатидилинозитола (ФИ) и сфингомиелина (СМ). Процентное соотношение фосфатидилэтаноламина (ФЭА) и фосфатидилсерина (ФС) оставалось без изменений.

Тио- и аза-краун-эфиры изменяли процентное содержание только СМ и ЛФХ. Направленность этих изменений была такой же, как и при воздействии классических краун-эфиров.

Статистически достоверно возросло содержание лизоформ фосфатидилхолинов (ЛФХ) и фосфатидилэтаноламина (ЛФЭА) под действием обеих групп исследуемых соединений.

Влияние исследуемых соединений на процентное соот-

ношение фосфолипидов, которые транспортируются липопротеинами крови к другим тканям [11].

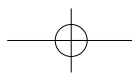
Так как КЛ являются основными липидными компонентами мембран митохондрий [10, 11], изменение их концентрации, а вследствие этого и липидного окружения ферментов митохондриальных мембран может быть одной из причин нарушения процессов биоэнергетики, о чем свидетельствуют полученные нами результаты снижения активности сукцинатдегидрогеназы и АТФ-азы в печени [3].

Следует отметить, что повышение содержания лизоформ в фосфолипидных фракциях

Таблица 4

Интенсивность БХЛ (имп/с) органов и сыворотки крови белых крыс при воздействии краун-эфиров (1/100 ДЛ₅₀)

Вещество	Сыворотка крови	Печень	Головной мозг	Надпочечники
Контроль	280±20	820±30	370±23	400±20
12-краун-4	638±12*	1860±44*	680±18*	128±25*
15-краун-5	582±23*	1223±55*	620±51*	805±11*
18-краун-6	560±21*	1120±26*	530±26*	1060±19*



THE EVALUATION OF THE STABILITY OF THE BIOLOGICAL MEMBRANES ON THE EFFECTS OF CROWN-AETHER

Kratenko R.I.

The influence of crown-ethers (12-crown-4, 15-crown-5, 18-crown-6) and pseudo-crown-ethers (thio-12-crown-4, thio-15-crown-5, aza-12-crown-4) derivatives on hepatocyte and erythrocyte phospholipid composition, membrane permeability to K⁺ and intensity of biochemiluminescence of tissues and

biological liquids was studied. The increase in lysophospholipid concentration in hepatocyte and erythrocyte membranes, enhancing erythrocyte membrane permeability to K⁺, increasing intensity of biochemiluminescence of tissues and biological liquids were found. Correlation between investigated parameters may be the base to consider biochemiluminescence as a rapid and effective method of membrane stability indication.

ность свободнорадикального окисления тканевых липидов и служит основным тестом в комплексной диагностике свободнорадикальной патологии [8].

Как видно из таблиц 4 и 5, оба класса исследуемых веществ оказывали одинаковое влияние на интенсивность БХЛ (повышали ее приблизительно в 2 раза). Результаты БХЛ хорошо коррелировали с интенсивностью ПОЛ, изменениями в структуре мембран и их проницаемостью.

Нами было обнаружено, что у крыс, затравленных краун-эфиром, повышалось образование активных форм кислорода — инициаторов свободнорадикальных процессов [2-4]. При этом выявлено накопление продуктов ПОЛ (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) в печени и сыворотке крови.

БХЛ используется как интегральный показатель интенсивности протекания свободнорадикальных процессов и ПОЛ [8]. Хемиллюминограммы несут также информацию о суммарной мощности системы антиоксидантной защиты.

Сопоставление полученных нами данных по состоянию компонентов антиоксидантной системы (ферментативных и неферментативных) о накоплении первичных и вто-

ричных метаболитов ПОЛ по изменению проницаемости мембран и их фосфолипидного состава с результатами по спонтанной и индуцированной БХЛ дает основание рассматривать хемиллюминесценцию как быстрый и эффективный метод оценки стабильности биологических мембран. При этом важным является сочетание разных индукторов (в первую очередь, Fe²⁺, люминола, перекиси водорода), а также полная расшифровка хемиллюминограмм.

Выводы

□ Краун- и псевдокраун-эфир существенно изменяли фосфолипидный состав мембран эритроцитов и гепатоцитов белых крыс, увеличивая процентное содержание лизоформ.

□ Действие исследованных веществ также приводило к увеличению проницаемости мембран и интенсивности биохемиллюминесценции тканей и сыворотки крови крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максютин Н.П., Ветютнева П.А., Назаренко А.Ю., Митченко Ф.А. Перспективы применения краун-эфиров для экстракционно-фотометрического определения щелочных металлов в лекарственных препаратах // Фармацевтический журнал. — 1991. — № 3. — С. 67-74.

2. Кратенко Р.И. Биологическая активность краун-эфиров в связи с проблемой охраны водных объектов. — Харьков: ХГМУ, 2001. — 207 с.

3. Кратенко Р.И. Состояние антиоксидантной системы, окислительно-восстановительных процессов и перекисного окисления липидов у крыс при действии ксенобиотиков // Экспериментальна і клінічна медицина. — 2002, № 4. — С. 12-16.

4. Жуков В.И., Митряев А.Б., Кратенко Р.И. Дія іонізувального випромінення та 12-краун-4 на активність антиоксидантної системи й інтенсивність перекисного окислення ліпідів // Український радіологічний журнал. — 2001. — № 1. — С. 37-40.

5. Биологические мембраны / Под ред. Дж. Финдлея и У. Эванса. — М.: Мир, 1990. — 400 с.

6. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.

7. Vaskovsky V.E., Terekkiye T.A. URTTC of phospholipids mixtures containing phosphatidyl glycerols // J. High Res. Chromatogr. — 1979. — V. 2, № 11. — P. 671-672.

8. Журавлев А.И. Спонтанная биохемиллюминесценция животных тканей / В кн: Биохемиллюминесценция. — М., 1983. — С. 3-29.

9. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 154 с.

10. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. — М.: Мир, 1980. — 366 с.

11. Murray R.K., Granner D.K., Mayers P.M. Harper's biochemistry. — USA: Appleton & Lange. — 1993. — 567 p.

12. Барабой В.А., Карнаух И.М., Орел В.Н. Перекисное окисление и радиация. — К.: Наукова думка, 1991. — 256 с.

Таблица 5
Интенсивность БХЛ (имп/с) сыворотки крови и мочи белых крыс при воздействии псевдо-краун-эфиров (1/100 ДЛ₅₀)

Вещество	Сыворотка крови		Моча	
	15 суток	30 суток	15 суток	30 суток
Контроль	976±28	1020±40	750±20	830±18
Аза-12-краун-4	1809±58*	2150±79*	1379±57*	1656±59*
Тио-12-краун-4	1730±54*	1890±31*	1206±35*	1380±50*
Тио-15-краун-5	1700±62*	1720±46*	1166±30*	1420±33*