

УДК 616.36-002.1-008.9-092.9:577.15

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СФИНГОМИЕЛИНОВОГО ЦИКЛА И КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ СФИНГОМИЕЛИНА В ПЕЧЕНИ КРЫС В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

В.Ю. Серебров*, Д.И. Кузьменко, П.Г. Буров, О.Б. Санугольцева

Кафедра биохимии и молекулярной биологии ГОУ ВПО “Сибирский
государственный медицинский университет Росздрава”, 634050, г. Томск,
ул. Московский тракт, 2; тел.: 8-(3822)-42-09-61;
эл. почта: serebrov@ssmu.ru, dik51@mail.ru

В печени крыс, изучали активность ключевых ферментов сфингомиелинового цикла и содержание его компонентов (сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата) в динамике острого токсического гепатита, вызванного подкожным введением масляного раствора тетрахлорметана. Активность сфингомиелиназы достоверно увеличивалась уже на ранних сроках и оставалась повышенной на всем протяжении периода наблюдения. Активность церамидазы существенно отличалась от контроля. Содержание сфингомиелина и сфингозин-1-фосфата не претерпевали заметных изменений, в то время как содержания церамида достоверно увеличивалось. При этом баланс между содержанием в печени крыс проапоптотика церамида и сфингозин-1-фосфата, являющегося антиапоптотическим фактором, на всем протяжении периода наблюдения был смещен в сторону церамида. В молекулах сфингомиелина происходило достоверное уменьшение содержания жирных кислот $C_{18:1}$ и $C_{22:2}$, в то время как в составе молекул церамида и сфингозин-1-фосфата – жирной кислоты $C_{22:2}$. Несмотря на достоверное уменьшение содержания только некоторых длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, расчетные коэффициенты насыщенности жирнокислотного компонента в молекулах компонентов сфингомиелинового цикла, в целом, не отличались от таковых в группе контроля.

С учётом данных литературы, полученные нами результаты позволяют полагать, что в патогенезе острого токсического гепатита процессы церамид-опосредованного апоптоза, играют существенную роль. Элиминация поврежденных гепатоцитов облегчает реализацию репаративных процессов и способствует оптимизации клеточного сообщества печени.

Ключевые слова: острый токсический гепатит, сфингомиелиновый цикл.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Гепатиты неинфекционного генеза, с учетом тенденции к росту их доли среди заболеваний гепатобилиарной системы, остаются серьезной медико-социальной проблемой [1]. Традиционные гепатопротекторы, репарирующие дефекты мембранного бислоя гепатоцитов и/или устраняющие функциональный дефицит системы антиоксидантной защиты печени, не всегда позволяют достигнуть высокого терапевтического эффекта, поскольку затрагивают лишь часть звеньев патогенеза. Перспективным для оптимизации фармакологической коррекции нарушений структурно-функционального состояния печени при неинфекционных гепатитах является подход, в основе которого будет положена целенаправленная стимуляция внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих сохранение жизнеспособности клетки. Цель исследования – на модели острого токсического гепатита изучить в печени динамику активности ключевых ферментов сфингомиелинового (СМ) цикла и концентрации его компонентов, которые опосредуют регуляцию баланса между процессами программированной гибели клеток и пролиферации [2].

МЕТОДИКА. Исследования выполнены на белых крысах-самцах Вистар, массой 190-200 г. 1 группу животных (контроль) составили 15 интактных крыс. 2 группу (опыт) составил 30 крыс, у которых вызывали острый токсический гепатит путем подкожного введения 50% масляного раствора CCl_4 , трехкратно с интервалом в 4 суток (0,45 мл раствора на 100 г массы). Животных 2 группы обследовали на 5, 10 и 15 сутки после первой инъекции CCl_4 . В сыворотке крови определяли активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ); концентрацию общего билирубина (ОБР) и проводили тимоловую пробу с помощью тест-систем фирмы “Лахема” (Чешская Республика). Перед забором образцов печени, у наркотизированных животных орган перфузировали ледяным физиологическим раствором. Об активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате печени судили по содержанию продуктов, взаимодействующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК–активных продуктов) [3]. Активность нейтральной сфингомиелиназы (СМазы) в гомогенате печени определяли согласно [4], церамидазы – [5] по уменьшению в инкубационной смеси концентрации субстратов – сфингомиелина и церамида. По окончании инкубации соответствующих проб, реакцию останавливали добавлением смеси Фолча (хлороформ : метанол = 2:1). Содержание сфингомиелина и церамида определяли методом хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Sorbfil (ЗАО “Сорбполимер”, Россия) в системе растворителей толуол : метанол = 7:3. Содержание компонентов сфингомиелинового цикла в печени также определяли методом тонкослойной хроматографии, как описано выше, после экстракции липидов из 10% гомогената по Фолчу. В качестве свидетелей использовали стандартные растворы соответствующих соединений, производства фирмы “Sigma-Aldrich”. Жирнокислотный состав молекул сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата оценивали методом газовой хроматографии с помощью хроматографа Цвет-800 на колонке (2500×3 мм) с 10%-ным Silar 10С на хромосорбе W-HP при программировании температуры от 160° до 240° со скоростью 4 град/мин и скоростью газа-носителя (гелий) 40 мл/мин. Белок в гомогенате определяли по Лоури. Морфологию печени изучали после окраски срезов гематоксилин-эозином методами оптической микроскопии. Достоверность отличий изучаемых параметров между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В сыворотке крови животных, получивших инъекции CCl_4 , увеличивалась концентрация ОБР (максимум на 5 сутки с тенденцией к снижению на 15 сутки; $p < 0,05$) и активность обеих аминотрансфераз (максимум к 10 суткам с тенденцией к уменьшению к концу периода наблюдения; $p < 0,05$). Этим же срокам соответствовали максимальные значения тимоловой пробы ($p < 0,05$). В печени возрастала концентрации

ТБК-активных продуктов: $5,76 \pm 0,43$, $6,76 \pm 0,45$ и $7,89 \pm 0,65$ нмоль/мг белка на 5, 10 и 15 сутки соответственно, против контроля $3,16 \pm 0,06$ нмоль/мг белка ($p < 0,05$). Исследование морфологии печени выявило признаки гидропической и ацидофильной дистрофий, а также некроз части гепатоцитов. Индекс гистологической активности (ИГА) был увеличен уже к 5 суткам и достигал максимума на 10 и 15 сутки наблюдения: $12,5 \pm 0,83$ и $12 \pm 0,81$ баллов соответственно (контроль: $1,5 \pm 0,13$; $p < 0,05$). Величина ИГА, превышающая 12 баллов, свидетельствовала о выраженном и остро протекающем воспалительном процессе. Таким образом, комплекс данных морфо-функционального исследования печени подтвердил наличие острого гепатита на 5-15 сутки наблюдения.

Активность СМазы увеличивалась уже на ранних сроках и оставалась повышенной до конца эксперимента ($p < 0,05$). Активность церамидазы менялась незначительно (табл. 1). Содержание сфингомиелина и сфингозин-1-фосфата в печени не претерпевало заметных сдвигов, но на 10 и 15 сутки наблюдения было отмечено увеличение содержания церамида ($p < 0,05$) (табл. 1). Для жирнокислотного состава компонентов СМ цикла в печени крыс характерными были односторонние сдвиги (табл. 2). В составе сфингомиелина уменьшалось содержание жирных кислот $C_{18:1}$ и $C_{22:2}$, в то время как в церамиде и сфингозин-1-фосфате уменьшалось содержание только жирной кислоты $C_{22:2}$ ($p < 0,05$). Несмотря на уменьшение содержания некоторых длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, что, скорее всего, было обусловлено активацией процессов ПОЛ, коэффициенты насыщенности жирнокислотного компонента молекул сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата, в целом, не отличались от таковых в группе контроля (табл. 3). По-видимому, такие сдвиги жирнокислотного состава не оказали модулирующего влияния на проявление биоэффектов компонентов СМ цикла [6, 7].

Таблица 1. Активности сфингомиелиназы и церамидазы (мкг/мин×мг белка) и содержание сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата (мкг/мг белка) в печени крыс при остром токсическом гепатите.

Исследуемый показатель	Контроль	Сроки наблюдения, сутки		
		5	10	15
СМаза	$31,18 \pm 1,29$	$41,84 \pm 2,56^*$	$45,67 \pm 3,11^*$	$43,39 \pm 2,17^*$
Церамидаза	$3,97 \pm 0,26$	$2,34 \pm 0,17$	$4,12 \pm 0,27$	$3,54 \pm 0,31$
СМ	$14,31 \pm 1,13$	$15,67 \pm 1,12$	$14,97 \pm 1,31$	$13,97 \pm 1,29$
Церамид	$5,63 \pm 0,34$	$7,81 \pm 0,65$	$8,34 \pm 0,76^*$	$9,12 \pm 0,74^*$
С1Ф	$34,12 \pm 2,17$	$33,18 \pm 3,12$	$37,82 \pm 2,34$	$30,33 \pm 2,98$

Примечание: Здесь и в табл. 3: СМаза - сфингомиелиназа; С1Ф - сфингозин-1-фосфат; СМ - сфингомиелин. * - ($p < 0,05$) достоверность отличий по сравнению с показателем группы контроля. Представлены средние \pm ошибки средних.

СФИНГОМИЕЛИНОВЫЙ ЦИКЛ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Таблица 2. Состав жирных кислот сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата (в % от общего количества жирных кислот) в печени крыс при остром токсическом гепатите.

Исследуемый показатель	Контроль	Сроки наблюдения, сутки		
		5	10	15
1	2	3	4	5
Сфингомиелин				
16:0	51,82±3,21	50,31±4,92	49,72±4,71	52,33±5,14
16:1	2,14 ±0,13	2,33±0,27	1,92±0,29	2,23±0,24
18:0	9,35±0,48	9,76±0,84	10,12±0,99	9,97±0,95
18:1	0,98±0,05	0,45±0,03*	0,37±0,02*	0,39±0,02*
18:2	1,12±0,11	0,93±0,08	1,27±0,11	1,37±0,12
20:0	3,57±0,26	3,33±0,23	3,94±0,37	3,22±0,29
22:2	7,13±0,56	5,34±0,34*	5,75±0,45*	4,86±0,47*
Церамид				
16:0	51,82±3,21	51,84±4,12	50,31±4,98	48,76±4,71
16:1	2,13±0,13	2,12±0,21	1,98±0,17	2,31±0,19
18:0	9,34±0,48	9,33±0,91	9,13±0,87	9,45±0,93
18:1	0,95 ±0,05	0,92±0,08	0,99±0,08	1,11±0,09
18:2	0,17±0,01	0,19±0,01	0,21±0,01	0,18±0,01
20:0	3,56±0,26	3,54±0,31	3,31±0,29	3,21±0,27
22:2	7,17±0,56	6,24±0,61*	6,34±0,62*	6,11±0,57*
Сфингозин-1-фосфат				
16:0	51,81 ±3,21	52,34±5,12	53,12±5,13	50,17±4,76
16:1	2,13 ±0,13	2,14±0,21	2,31±0,21	2,22±0,19
18:0	9,32±0,48	9,12±0,87	9,71±0,85	9,54±0,91
18:1	0,92±0,05	0,95±0,08	0,78±0,06	0,83±0,07
18:2	0,21±0,01	0,23±0,01	0,32±0,02	0,29±0,02
20:0	3,56 ±0,26	3,57±0,31	3,31±0,32	3,12±0,32
22:2	7,15±0,56	6,34±0,61*	6,12±0,57*	5,76±0,43*

Примечание: * (p<0,05) - достоверность различий по сравнению с показателем животных группы контроля.

Таблица 3. Коэффициент насыщенности жирных кислот в составе сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата в печени крыс при остром токсическом гепатите.

Исследуемый показатель	Контроль	Сроки наблюдения, сутки		
		5	10	15
КН_{СМ}	5,69±0,43	7,01±0,65	6,85±0,63	7,40±0,71
КН_{церамид}	6,21±0,54	6,80±0,59	6,59±0,63	6,33±0,58
КН_{С1Ф}	6,18±0,61	6,73±0,54	6,94±0,65	6,90±0,71

Известно, что в основе возникновения алкогольной болезни и лекарственного гепатита лежит окислительный стресс [8]. Свободнорадикальные индукторы окислительного стресса оказывают не только прямое цитотоксическое воздействие, но и опосредованное – путем стимуляции секреции иммунокомпетентными клетками спектра цитокинов, в том числе, фактора некроза опухоли- α , являющегося индуктором СМ-цикла и церамид-опосредованного апоптоза гепатоцитов [8-11]. Наши результаты согласуются с данными литературы, поскольку баланс между содержанием в печени крыс проапоптотика церамида и сфингозин-1-фосфата, который является антиапоптотическим фактором [2, 12], на всем протяжении периода наблюдения был смещен в сторону церамида (табл. 1).

Между активностью СМазы печени и функциональным состоянием щитовидной железы существует прямая зависимость [4]. Гепатотропные токсические агенты могут негативно влиять на работу щитовидной железы опосредованно – нарушая осуществляемый печенью этап конверсии тироксина. Однако проявление такого действия и, следовательно, подавление активности СМазы, требует длительного воздействия высоких доз гепатотропного токсиканта, приводящих к фиброзу или циррозу печени [13]. В рамках наших исследований потенциально возможное подавление функций щитовидной железы и активности СФМазы можно исключить, поскольку использованная доза тетрахлорметана вызывала обратимое повреждение печени. Так, ранее нами было показано [14], что острый токсический гепатит, вызванный по схеме и с использованием доз CCl_4 , как в настоящей работе, в отсутствие каких-либо корригирующих воздействий, имел благоприятный исход. Вплоть до отдаленных сроков наблюдения (спустя 45 суток после завершения введения CCl_4) мы не наблюдали гибели животных, не было зарегистрировано случаев формирования морфологических признаков фиброза или цирроза печени. На 45-е сутки наблюдения биохимические параметры не отличались от контроля, а морфологическое обследование выявило признаки преобладания спонтанного восстановления структуры печени, начиная с 17-19 суток после завершения введения CCl_4 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты настоящей работы, а также итоги исследований, проведенных нами ранее, согласуются с данными литературы и указывают на то, что при повреждении печени под влиянием химических агентов, “переключение” между некрозом или апоптозом гепатоцитов зависит от их дозы: высокая доза обуславливает преобладание некроза, относительно низкие дозы – апоптоза [15, 16]. Полученные нами результаты позволяют полагать, что в патогенезе острого CCl_4 -гепатита в рамках нашей модели, процессы церамид-опосредованного апоптоза, играют существенную роль. При этом происходит элиминация определенной части поврежденных гепатоцитов, что облегчает реализацию

СФИНГОМИЕЛИНОВЫЙ ЦИКЛ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

репаративных процессов и способствует оптимизации клеточного сообщества печени. Этим можно объяснить благоприятное течение гепатита и сравнительно высокую степень спонтанного восстановления нарушенных функций органа, что было продемонстрировано нами ранее с использованием этой же дозы CCl_4 .

ЛИТЕРАТУРА

1. *Heathcote J., Walness I.R.* (1995) *Gastroenterologist*, **3**(2), 119-129.
2. *Colombaioni L., Garcia-Gil M.* (2004) *Brain Res. Rev.*, **46**, 328-355.
3. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* (1977) *Современные методы в биохимии, Медицина, М.*, 66-68.
4. *Бабенко Н.А.* (1991) *Биохимия*, **56** (2), 346-353.
5. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* (1978) *Липолитические ферменты*, Наука, М.
6. *Дятловицкая Э.В.* (1995) *Биохимия*, **60**, 843-849.
7. *Дятловицкая Э.В.* (1998) *Биохимия*, **63**, 67-74.
8. *Буверов А.О.* (2005) *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.*, **12**(4), 21-25.
9. *Ярилин А.А.* (1998) *Патол. физиол.*, №2, 38-45.
10. *Guvillier O.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1585**, 800-803.
11. *Wilkins G.* (2000) *J. Pediatr.*, **136**, 521-528.
12. *Alessenko A.V.* (2000) *Membr. Cell. Biol.*, **13**(2), 303-320.
13. *Туракулов Я.Х., Таиходжаева Т.П., Артыкбаева Г.М.* (1991) *Пробл. эндокринолог.*, **37**(4), 44-46.
14. *Кузьменко Д.И.* (1999) *Коррекция нарушений при токсическом гепатите комплексным воздействием модифицированными природными и преформированными физическими факторами (экспериментальное исследование). Дисс. докт. наук, НИИ курортологии и физиотерапии Росздрава, Томск.*
15. *Nanji A.A.* (1998) *Semin. Liver Dis.*, **18**, 187-190.
16. *Kaistura J., Cheng W., Reiss K.* (1996) *Lab. Invest.*, **74**, 86-107.

Поступила: 19. 06. 2008.

ACTIVITY OF ENZYMES OF A SPHINGOMYELIN CYCLE AND CONCENTRATION OF PRODUCTS OF SPHINGOMYELIN DEGRADATION IN THE LIVER OF RATS IN DYNAMICS OF THE ACUTE TOXIC HEPATITIS

V.Yu. Serebrov, D.I. Kuzmenko, P.G. Burov, O.B. Sapugoltseva

Department of biochemistry and molecular biology of the Siberian State Medical University, Tomsk, Moskovsky tract, 2, Russia 634050; tel.: 8-(3822)-42-09-61; e-mail: serebrov@ssmu.ru, dik51@mail.ru

Activity of key enzymes of a sphingomyelin cycle and the maintenance of its components (sphingomyelin, ceramide and sphingosine-1-phosphate) have been studied in livers of rats in dynamics of the acute toxic hepatitis caused by hypodermic introduction of an oil solution of CCl₄. Sphingomyelinase activity significantly increased already on early terms and remained increased over the whole period of observation. Activity of ceramidase insignificantly differed from the control level. The levels of sphingomyelin and sphingosine-1-phosphate did not undergo marked changes while ceramide content significantly increased. Thus, balance between liver content of ceramide (proapoptotic) and the sphingosine-1-phosphate, being the antiapoptotic factor, was shifted towards ceramide. In sphingomyelin molecules there was a significant decrease in the content of fatty acids C_{18:1} and C_{22:2}, while in ceramide molecules and sphingosine-1-phosphate only fatty acid C_{22:2} changed. In spite of significant decrease in content of some unsaturated fatty acids, calculated unsaturation coefficients of the fatty acid component of the sphingomyelin cycle metabolites.

Thus, our results together with literature data suggests involvement of ceramide-mediated apoptosis in the pathogenesis of acute toxic hepatitis. Elimination of damaged hepatocytes facilitates realization of repair processes and optimization of cellular community of a liver.

Key words: acute toxic hepatitis, sphingomyelin cycle.