

УДК 577.352.3

## ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

© 2019 B. Szachowicz-Petelska

*Institute of Chemistry, University in Bialystok, Ciolkowskiego 1K,  
15-245 Bialystok, Poland; E-mail: basia@uwb.edu.pl*

Поступила в редакцию 15.12.17

После доработки 21.08.18

Принята к публикации 21.08.18

Оценка качественного и количественного содержания различных липидных компонентов мембран необходима для правильной интерпретации процессов, протекающих в биологических мембранах. Изменения структуры и функции химических компонентов клеточных мембран тесно связаны с окислительным стрессом. Окислительный стресс индуцируется, в частности, при хроническом употреблении этанола, а также при злокачественном перерождении клеток и сопряжен с изменениями уровней фосфолипидов и жирных кислот в клеточной мембране. В представленной работе мы использовали хроматографию высокого давления (ЖХВД), чтобы оценить влияние алкоголя и злокачественного перерождения на химический состав мембран, а именно, на количество фосфолипидов и свободных жирных кислот в клеточной мембране. Было продемонстрировано увеличение уровней различных фосфолипидов в мембранах клеток печени крыс, обработанных этанолом. Процесс злокачественной трансформации клеток слизистой толстой кишки человека сопровождался увеличением уровней фосфолипидов, а также снижением количества линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот, но увеличением уровней арахидоновой и олеиновой кислот. В настоящем исследовании мы пытались ответить на вопрос: какое влияние эти изменения в количестве липидных компонентов оказывают на строение мембран и состояние клеток. Мы предполагаем, что нарушение клеточных функций может проявляться в форме изменений липидного состава, а поэтому и деятельности клеточной мембраны.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фосфолипиды, свободные жирные кислоты, этанол, рак.

**DOI:** 10.1134/S032097251902009X

Мембраны играют центральную роль как в структуре, так и в функционировании клеток; они определяют структуру внутриклеточных компартментов и контролируют взаимосвязь между внутриклеточной и внеклеточной средой. Все мембраны имеют единую структуру: липидный бислой со встроенными в него белками [1].

Окислительный стресс связан с изменениями структуры и функций различных компонентов клеточных мембран. Некоторые внеклеточные и внутриклеточные факторы могут принимать участие в инициации клеточного стресса и повреждении клеток; к ним относятся хроническое употребление этанола и злокачественное перерождение. Оба эти фактора инициируют продукцию реактивных форм кислорода (РФК). Окислительный стресс, индуцированный хро-

ническим употреблением этанола, или возникающий при злокачественном перерождении клеток, связан с изменениями структуры и функций химических компонентов клеточных мембран, в частности, таких, как фосфолипиды и жирные кислоты. При этом любые нарушения деятельности клетки проявляются в изменениях деятельности клеточной мембраны [2, 3].

Детектирование изменений в содержании фосфолипидов и жирных кислот проводили с использованием жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД). Липидные компоненты мембран могут находиться под влиянием этанола (внешний фактор) и злокачественной трансформации (внутренний фактор). В этой работе проверяется гипотеза о том, что состав клеточных мембран может косвенно отражать изменения, возникающие в мембранах во время злокачественной трансформации клеток и/или при этаноловой интоксикации. В связи с этим в процессе работы мы документировали изменения количества различных фосфолипидов и свободных жирных кислот в клеточных мембранах.

Принятые сокращения: РФК – реактивная форма кислорода, PI – фосфатидилинозит, PS – фосфатидилсерин, PE – фосфатидилэтанолламин, PC – фосфатидилхоллин, AA – арахидоновая кислота, LA – линолевая кислота, PA – палмитолеиновая кислота, ALA –  $\alpha$ -линоленовая кислота.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Этаноловая интоксикация.** Крысам некоторых групп давали вместо воды купленный в местном супермаркете сок черной смородины (*Ribes nigrum L.*), который содержал 28% чистого сока. Поилки емкостью 250 мл постоянно пополняли. Содержание в соке фенолов контролировали спектрофотометрически с использованием фенолового реагента Фоли-Чикатлей [4]. Экстракт сахарной травы, использованный в экспериментах, содержал кумарин (312 мг/мл), 5,8-дигидроксикумарин (4,2 мг/л) и 5-гидрокси-8-О-β-D-глюкопиранозил-бензопиранон (3,1 мг/л). Уровни этих соединений определяли с помощью газового хроматографа, укомплектованного MS/MS детектором [5].

**Животные.** В экспериментах были использованы самцы крыс линии Wistar возрастом 12 месяцев. Животные проживали свободно сформированными группами, питались стандартной зерновой пищей и водой и содержались в условиях нормального цикла день/ночь.

Животные были разделены на 4 группы по 6 особей в каждой ( $n = 6$ ):

1) Крыс контрольной группы (*control*) обрабатывали интрагастрально 1,8 мл физраствора ежедневно в течение 4 недель ( $n = 6$ ).

2) Крысам группы *blackcurrant* (или группы *sweet grass*) давали пить сок черной смородины (или травяной экстракт с содержанием кумарина 10 мг/мл) вместо воды в течение 1 недели. Затем животных обрабатывали интрагастрально 1,8 мл физраствора, и продолжали вместо воды поить соком черной смородины (травяным напитком) ежедневно в течение 4 недель ( $n = 6$ ).

3) Крыс группы *ethanol* обрабатывали интрагастрально 1,8 мл этанола в дозах 2,0–6,0 г/кг тела ежедневно в течение 4 недель. Дозу этанола увеличивали постепенно со скоростью 0,5 г/кг каждые 3 дня ( $n = 6$ ).

4) Крысам группы *ethanol + blackcurrant* (или *ethanol + sweet grass*) давали пить сок черной смородины (или травяной экстракт) в течение 1 недели. Затем их обрабатывали 1,8 мл этанола в дозах 2,0–6,0 г/кг тела и продолжали поить соком черной смородины (или экстрактом травы) вместо воды ежедневно в течение 4 недель.

После проведения процедур обработки, всех животных (по 6 животных в каждой группе) декапитировали под наркозом. Печень быстро извлекали и помещали в ледяной раствор 0,15 М NaCl.

**Злокачественное перерождение.** Образцы тканей (опухоли толстой кишки и нормальная слизистая толстой кишки) были получены от пациентов, подвергнутых хирургической резекции в

связи с раком толстой кишки. Возраст пациентов 37–84 лет, причем ни один из них не получал ни радио-, ни химиотерапии до резекции опухоли. Установление степени метастазирования проводили в 4 этапа, что является вполне достаточным минимумом для клинической характеристики опухоли. Образцы опухоли и нормальной слизистой забирали сразу после извлечения. Кусочки ткани, соответствующие неизмененной слизистой, забирали на расстоянии  $\geq 10$  см от опухоли. Раковые клетки отличались от нормальных по размеру. Наши исследования позволили классифицировать данный вид рака гистопатологически как аденокарциному pT3 с метастазированием в лимфу в фазе G3. Для гистопатологических исследований ткани опухолей фиксировали 10%-ным формалином и запечатывали в парафиновые блоки. В соответствии со стандартной методикой, от парафиновых блоков отрезали слайды толщиной 3–5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Далее было сделано диагностирование опухоли толстого кишечника и патологические характеристики были определены по методике AJCC/UICC TNM (*American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer Tumor Node Metastasis*): были определены гистологический тип опухоли (HP) и степень гистологической дифференцировки (G).

**Выделение клеточных мембран.** Для изоляции клеточных мембран, 1,5 г ткани (печень, опухоль толстой кишки, слизистая толстой кишки) гомогенизировали в 1 мМ NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,6) и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Добавление CaCl<sub>2</sub> способствовало седиментации мембран, что было установлено путем определения активности 5'-нуклеотидазы [6]. Мембранные фрагменты отделяли от ядер и митохондрий методом зонального центрифугирования, как описано ранее [7]. Полученный осадок мембран суспендировали в сахарозе (1,22 г/мл) и наносили на слой сахарозы (1,16 г/мл.). Клеточные мембраны отделяли путем центрифугирования при 2000 g в течение 25–35 мин. Чистоту препаратов мембран оценивали путем спектрофотометрического определения активности 5'-нуклеотидазы, как было описано ранее [6].

**Выделение и анализ фосфолипидов.** Для экстракции фосфолипидов был использован метод Фолша [7]. Клеточные мембраны тканей промывали смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (v/v), а затем осадок промывали смесью хлороформ : метанол : 0,05 М CaCl<sub>2</sub> в воде = 8 : 4 : 3 (v/v/v). Суспензию центрифугировали при 500 g в течение 2 мин. Водную фазу отбирали и встряхивали со смесью хлороформ : метанол : вода = 3 : 48 : 47 (v/v/v). После расслоения, органические фазы объединяли и упаривали досуха. Полученный

осадок растворяли в 200 мкл смеси хлороформ : метанол = 3 : 2 (v/v) [8–11].

Изолированные фосфолипиды разделяли на колонке с силикагелем с использованием ЖХВД на необращенной фазе; в качестве элюента была использована смесь ацетонитрил : метанол : 85%-ная фосфорная кислота = 130 : 5 : 1,5 (v/v/v). Элюцию проводили в изократическом режиме со скоростью 1 мл/мин; детектирование — при 214 нм [8–11]. На рис. 1 представлена типичная картина разделения фосфолипидов 4 различных классов: фосфатидилинозит (PI), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилхолин (PC). PI элюировался первым, далее следовали PS, PE, PC.

**Выделение и анализ свободных ненасыщенных жирных кислот.** Взвесь клеточных мембран гомогенизировали в растворе 2%-ной уксусной кислоты в этиловом эфире (2/1 по объему). Смесь фильтровали через обезжиренный бумажный фильтр для удаления обломков клеток. Фильтрат центрифугировали при 500 g в течение 2 мин для его расслоения на водную и органическую фазы [12]. Водную фазу, содержащую ненасыщенные жирные кислоты, встряхивали с раствором 2%-ной уксусной кислоты в этиловом эфире (2/1 по объему). После расслоения смеси, органическую фазу отбирали и высушивали досуха. Полученный осадок растворяли в 200 мкл ацетонитрила. Изолированные свободные ненасыщенные жирные кислоты разделяли методом ЖХВД на обращенной фазе с исполь-

зованием колонки C18. Изократическую элюцию выполняли смесью ацетонитрил : вода = 7 : 3 (v/v) со скоростью 1 мл/мин; детектирование проводили при 214 нм [13].

На рис. 2 представлена типичная картина разделения различных полиненасыщенных жирных кислот: арахидоновая (AA), линолевая (LA), палмитолеиновая (PA), б-линоленовая (ALA), олеиновая (идентифицируется лишь в некоторых образцах). AA элюировалась первой, далее следовали LA, PA и ALA.

**Статистический анализ.** Все данные были представлены как средние значения  $\pm SD$  (для  $n = 6$ ). Различия между группами данных оценивали методом однонаправленного теста Тьюки для множественного сравнения. Данные анализировали по отдельности для каждой из обработанных групп. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Этаноловая интоксикация.** При интоксикации этанолом происходило увеличение содержания фосфолипидов в мембранах клеток печени у всех групп животных по сравнению с контрольной группой (рис. 3 и 4). Если крысам при обработке этанолом давали пить вместо воды сок черной смородины (группа *ethanol + blackcurrant*) или экстракт сахарной травы (группа *ethanol + sweet grass*), то повышение содержания

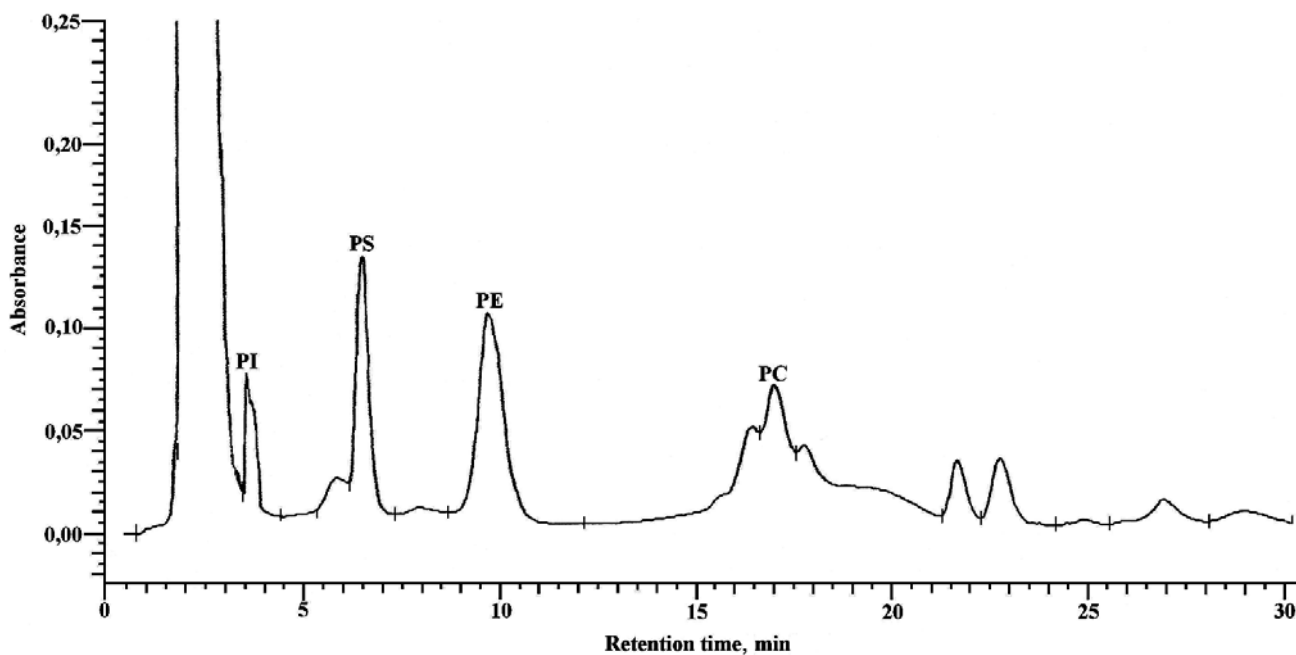


Рис. 1. Типичная картина разделения фосфолипидов четырех классов из мембран клеток печени крысы: фосфатидилинозит (PI), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилхолин (PC).

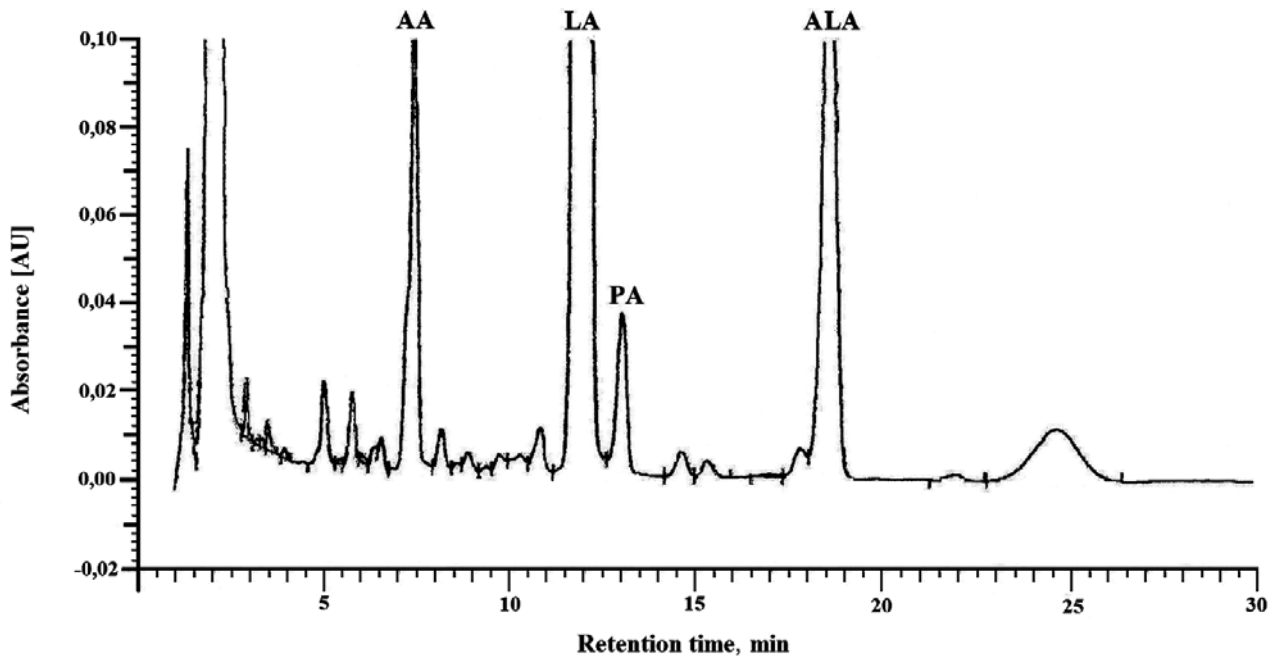


Рис. 2. Типичная картина разделения свободных ненасыщенных жирных кислот из клеток нормальной слизистой толстой кишки человека: арахидоновая (AA), линолевая (LA), палмитолеиновая (PA),  $\alpha$ -линоленовая (ALA).

PI, PS, PE и PC было менее значительным, чем в группе *ethanol*. У крыс, обработанных физраствором вместо этанола, но принимавших сок черной смородины (или травяной экстракт) (группы *blackcurrant* или *sweet grass*) существенных изменений в содержании фосфолипидов в мембранах клеток печени по сравнению с контролем не наблюдалось.

**Раковое перерождение.** При злокачественном перерождении клеток (рак толстого кишечника человека) наблюдалось увеличение содержания всех фосфолипидов в мембранах клеток трансформированной слизистой кишечника по сравнению с нормальной слизистой (рис. 5). Это преж-

де всего касалось PC, содержание которого было наиболее высоким в клетках как трансформированной, так и нормальной слизистой. Изменение уровней содержания полиненасыщенных жирных кислот представлено на рис. 6.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Этаноловая интоксикация.** Полученные нами результаты продемонстрировали, что при интоксикации этанолом происходило повышение содержания фосфолипидов в мембранах клеток печени крыс (рис. 3 и 4). Ранее мы и другие ав-

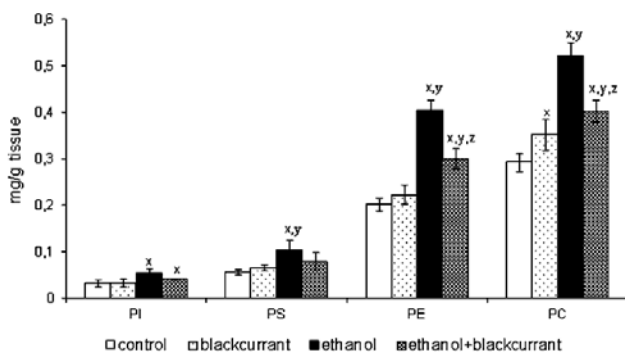


Рис. 3. Количество фосфолипидов в мембранах клеток печени крыс, обработанных этанолом в присутствии сока черной смородины. Статистически значимые различия  $p < 0,05$  по отношению: x – к группе *control*; y – к группе *blackcurrant*; z – к группе *ethanol*

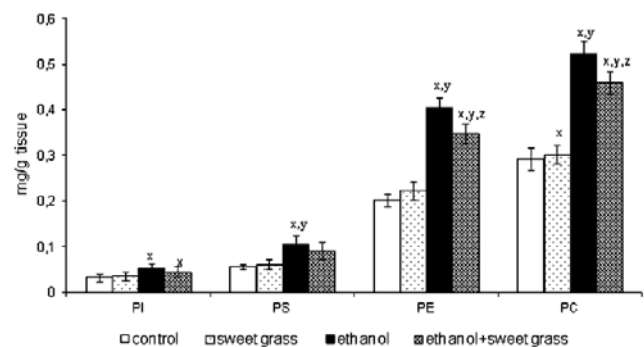


Рис. 4. Количество фосфолипидов в мембранах клеток печени крыс, обработанных этанолом в присутствии экстракта сахарной травы. Статистически значимые различия  $p < 0,05$  по отношению: x – к группе *control*; y – к группе *sweet grass*; z – к группе *ethanol*

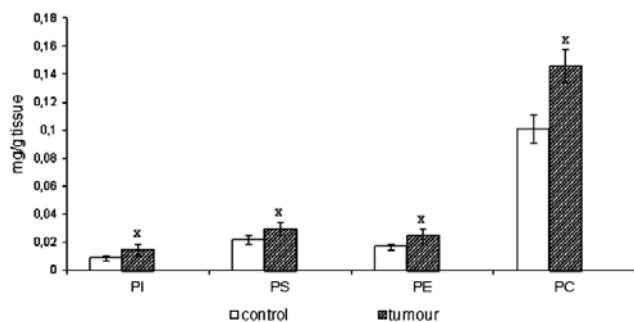


Рис. 5. Содержание различных фосфолипидов в мембранах клеток рака толстой кишки человека (опухоль pT3, фаза G3 с метастазами). x –  $p < 0,05$  по отношению к группе control

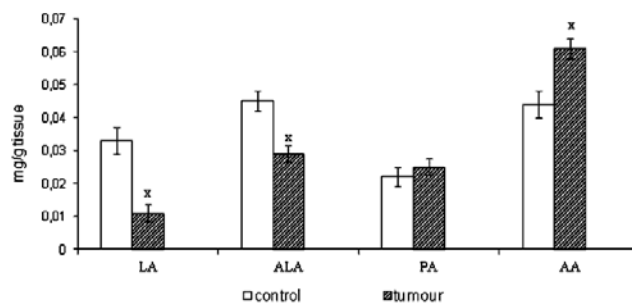


Рис. 6. Содержание полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток рака толстой кишки человека (опухоль pT3, фаза G3 с метастазами). x –  $p < 0,05$  по отношению к группе control

торы показали, что интоксикация этанолом приводила к повышению содержания фосфолипидов в мембранах клеток печени и в эритроцитах [3, 4, 9, 14–16]. Также, этанол влиял на активность фосфолипид-модифицирующих ферментов, включая ферменты, принимающие участие в метаболизме PE и PC [17, 18]. Таким образом, этаноловая интоксикация может инициировать повышение уровня специфических фосфолипидов. Кроме того, присутствие этанола может способствовать повышению уровня диацилглицерина, молекула которого принимает участие в ресинтезе фосфолипидов [14]. Метаболизм алкоголя сопровождался накоплением РФК, которые, будучи высоко реакционноспособными, могут вызывать окислительную модификацию липидов в мембранах [19, 20]. Полиненасыщенные жирные кислоты особенно подвержены перекисному окислению под действием РФК [21, 22].

Этанольная интоксикация изменяет клеточный метаболизм в основном из-за реакций различных соединений со свободными радикалами. Черная смородина обогащена мономерными и полимерными формами фенольных соединений, препятствующих окислению липидов и белков. Показано, что фенольные соединения являются эффективными антиоксидантами, ингибирующими окисление липидов [4, 23]. Кроме того, некоторые компоненты черной смородины могут ингибировать активность ферментов, участвующих в катаболизме липидов, например, фосфолипазы A<sub>2</sub> [24].

Другим примером оздоравливающего растения является сахарная трава, относящаяся к семейству Graminaceae. Экстракт из нее может задерживать перекисное окисление липидов [11]. Это растение содержит кумарин и его производные (5,8-дигидроксикумарин и 5-гидрокси-8-O-D-глюкопиранозилкумарин), для которых показана антиоксидантная активность [25, 26].

Компоненты сахарной травы могут воздействовать на клетки путем подавления свободнорадикальных реакций. Было установлено, что производные кумарина предотвращают формирование свободных радикалов путем ингибирования активности РФК-генерирующих ферментов [27]. Помимо этого, было показано, что производные кумарина ингибируют активность ксантиноксидазы [28]. Следовательно, сахарная трава предотвращала реакции РФК с различными клеточными компонентами, в том числе с липидами [11].

Известно, что уровни полиненасыщенных жирных кислот изменялись при многих патологических состояниях, а некоторые авторы сообщали об изменении концентрации этих кислот при длительном злоупотреблении алкоголем [29, 30]. Обнаружено, что уровни полиненасыщенных жирных кислот были снижены в мембранах эритроцитов, в сыворотке и плазме алкоголиков [31]. Поскольку подобные изменения обычно наблюдали у пациентов с заболеванием печени, они не могли быть прямо связаны с употреблением этанола, а скорее всего были следствием поражения печени, которое происходит при длительном злоупотреблении алкоголем [32]. Алкоголики значительно отличаются от неалкоголиков в отношении адсорбции и утилизации питательных веществ, включая пищевые жирные кислоты. Принимая во внимание практические и этические соображения при проведении подобных исследований на людях, не удивительно, что изучение взаимосвязей между потреблением алкоголя и концентрацией длинноцепочечных жирных кислот в тканях чаще всего проводили на животных [33].

**Злокачественное перерождение.** Модификация клеточных мембран может играть свою роль в трансформации нормальных клеток в раковые. Раковое перерождение является результатом целого ряда метаболических расстройств,

которые отражаются в изменениях содержания фосфолипидов в биологических мембранах. Повышенные уровни фосфолипидов мы наблюдали при исследовании рака толстой кишки человека (рис. 5), а также в опухолях молочных желез у мышей, раке мочевого пузыря и почек у человека [2, 9, 10, 34–38]. Причины этого повышения и ответственные за него механизмы могут сильно зависеть от типа клеток, фазы клеточного цикла и степени злокачественности раковых клеток. Наиболее значительные изменения в уровнях фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина наблюдались в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла, когда активность ферментов, контролирующих биосинтез, катаболизм и метаболизм фосфолипидов, наиболее высока [2, 34, 37, 39].

Гипоксия является одним из признаков рака. Внутриопухолевая гипоксия является следствием отсутствия функциональных кровеносных сосудов в пролиферирующей опухолевой ткани. Гипоксия связана с экспонированием анионных фосфолипидов, главным образом PS и PE, на поверхности клеток эндотелия опухолевых кровеносных сосудов [40, 41]. Поэтому PE, также, как и PS, потенциально служит признаком малой инвазивности опухоли и ее лекарственной уязвимости [42].

Полиненасыщенные жирные кислоты являются хемопротекторами, что связано с их способностью индуцировать изменения в составе клеточных мембранах и тем самым корректировать функции клеток [43]. Изменения количест-

ва свободных полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток рака толстой кишки человека при окислительном стрессе уже наблюдали ранее [13, 39]. Злокачественное перерождение клеток сопровождалось снижением уровней LA и ALA, но повышением уровней AA и олеиновой кислоты [13]. Примечательно, что уровни свободной AA были повышены в клетках рака толстой кишки и это связано с тем, что AA является предшественником биологически активных эйкозаноидов [44].

### Благодарности

Автор признателен своим коллегам на общем поле деятельности проф. З. Фигачевски, проф. Е. Скржидлевска и док. И. Добржинска за долгосрочное сотрудничество и интересные дискуссии.

### Соблюдение этических норм

Все эксперименты в исследованиях с участием животных выполняли в соответствии с рекомендациями Этического комитета в городе Белосток (Польша).

Обследование пациентов было выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинской декларации 1975 года с ее последующей переработкой в 2004 и одобренными Этическим комитетом медицинского университета в Белостоке. Все пациенты заранее дали свое согласие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson, H. (2015) Biological membranes, *Essays Biochem.*, **59**, 43–69.
2. Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z.A. (2010) Characterization of the cell membrane during cancer transformation, *J. Environ. Biol.*, **31**, 845–850.
3. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z.A. (2010) Effect of l-carnitine on liver cell membranes in ethanol-intoxicated rats, *Chem. Biol. Inter.*, **188**, 44–51.
4. Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z. A. (2012) Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol, *J. Membr. Biol.*, **245**, 191–200.
5. Luczaj, W., Stankiewicz-Kranc, A., Milewska, E., Roszkowska-Jakimiec, W., and Skrzydlewska, E. (2012) Effect of sweet grass extract against oxidative stress in rat liver and serum, *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 135–140.
6. Evans, W.H. (1970) Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation, *Biochem. J.*, **166**, 833–842.
7. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509.
8. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z.A. (2008) Effects of green on physico-chemical properties of liver cell membrane of different age rats intoxicated with ethanol, *Polish J. Environ. Stud.*, **17**, 327–333.
9. Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Skrodzka, M., Darewicz, B., Figaszewski, Z.A., and Kudelski, J. (2013) Phospholipid composition and electric charge in healthy and cancerous parts of human kidneys, *J. Membr. Biol.*, **246**, 421–425.
10. Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Figaszewski, Z.A., and Kudelski, J. (2014) Changes in the physico-chemical properties of human kidney cell membranes during the cancer transformation, *Adv. Biol. Chem.*, **4**, 223–231.
11. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z.A. (2013) Effect of sweet grass (*Hierochloe odorata*) on the physico-chemical properties of liver cell membranes from rats intoxicated with ethanol, *Environ. Toxicol. Pharm.*, **35**, 247–253.
12. Ostrowska, J., Skrzydlewska, E., Figaszewski, Z. (2000) Isolation and analysis of phospholipids, *Chem. Anal.*, **45**, 613–618.
13. Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z. (2007) Altered membrane free unsaturated fatty acid com-

- position in human colorectal cancer tissue, *Mol. Cell. Biochem.*, **294**, 237–242.
14. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Ostrowska, J., Skrzydlewska, E., and Figaszewski, Z. (2005) Protective effect of green tea on erythrocyte membrane of different age rats intoxicated with ethanol, *Chem. Biol. Inter.*, **156**, 41–53.
  15. Slater, S.J., Taddeo, F.J., Kelly, M.B., and Stubbs, C.D. (1993) Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation and ethanol, *Biochemistry*, **32**, 3714–3721.
  16. Hernandez, J.A., Lopez-Sanchez, R.C., and Rendon-Ramirez, A. (2016) Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, doi: 10.1155/2016/1543809.
  17. Sun, G.Y., and Sun, A.Y. (1985) Ethanol and membrane lipids, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **9**, 164–180.
  18. Tjburg, L.B., Maquedano, A., Bijleveld, C., Guzman, M., and Geelen, M.J. (1988) Effects of ethanol feeding on hepatic lipid synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 568–579.
  19. Bhattacharya, S. (2015) Reactive oxygen species and cellular defense system, *Free Rad. Hum. Health Disease*, **16**, 430–442.
  20. Galicia-Moreno, M., and Gutierrez-Reyes, G. (2014) The role oxidative stress in the development of alcoholic liver disease, *Rev. Gastroent. de Mexico*, **79**, 135–144.
  21. Skrzydlewska, E., Ostrowska, J., Stankiewicz, A., and Farbiszewski, R. (2002) Green tea as a potent antioxidant in alcohol intoxication, *Addict. Biol.*, **7**, 307–314.
  22. Skrzydlewska, E. (2003) Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning, *Toxicol. Mech. Methods*, **13**, 277–293.
  23. Cyunczyk, M., Jarocka, I., Hodun, T., and Hermanowicz, J. (2012) Protective effect of sweet grass and black berries beverages on ethanol induced disturbances in brain fatty acids, *Prog. Health Sci.*, **2**, 130–139.
  24. Arnold, E., Benz, T., Zapp, C., and Wink, M. (2015) Inhibition of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α) by medicinal plants in relations to their phenolic content, *Molecules*, **20**, 15033–15048.
  25. Kostova, I. (2006) Synthetic and natural coumarins as antioxidants, *Mini Rev. Med. Chem.*, **6**, 365–374.
  26. Thuong, P.T., Hung, T.M., Ngoc, T.M., Ha, T., Min, B.S., Kwack, S.J., Kang, T.S., Choi, J.S., and Bae, K. (2010) Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure activity relationships, *Phytother. Res.*, **24**, 101–106.
  27. Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., and van Leeuwen, P.A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 418–25.
  28. Lin, H.C., Tsai, S.H., Chen, C.S., Chang, Y.C., Lee, Z.Y., and Lin, C.M. (2008) Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical scavenging activities, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1416–25.
  29. Narce, M., Poisson, J.P., Bellenger, J., and Bellenger, S. (2001) Effect of ethanol on polyunsaturated fatty acid biosynthesis in hepatocytes from spontaneously hypertensive rats, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **25**, 1231–1237.
  30. Pawlosky, R.J., and Salem, N.J. (2004) Perspective on alcohol consumption: liver polyunsaturated fatty acids and essential fatty acid metabolism, *Alcohol*, **34**, 27–33.
  31. Yanagisawa, N., Shimada, K., Miyazaki, T., Kume, A., Kitamura, Y., Ichikawa, R., Ohmura, H., Kiyonagi, T., Hiki, M., Fukao, K., Sumiyoshi, K., Hirose, K., Matsumori, R., Takizawa, H., Fujii, K., Mokuno, H., Inoue, N., and Daida, H. (2010) Polyunsaturated fatty acid levels of serum and red blood cells in apparently healthy Japanese subjects living in an urban area, *J. Atheroscler. Thromb.*, **17**, 285–294.
  32. Kirpich, I.A., Miller, M.E., Cave, M.C., Joshi-Barve, S., and McClain, C.J. (2016) Alcoholic liver disease: update on the role of dietary fat, *Biomolecules*, **6**, 1–6.
  33. Festing, S., and Wilkinson, R. (2007) The ethics of animal research. Talking point on the use of animals in scientific research, *EMBO Rep.*, **6**, 526–530.
  34. Szachowicz-Petelska, B., Dobrzynska, I., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z.A. (2012) Characterization of the cell membrane during cancer transformation, in *Colorectal cancer biology – from genes to tumor*, Rajunor Ettarh (Ed.), *InTech*, pp. 241–256.
  35. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z.A. (2005) Changes in electric charge and phospholipid composition in human colorectal cancer cells, *Mol. Cell. Biochem.*, **276**, 113–119.
  36. Monteggia, E., Colombo, I., Guerra, A., and Berra, B. (2000) Phospholipid distribution in murine mammary adenocarcinomas induced by activated neu oncogene, *Cancer Detect. Prevent.*, **24**, 207–211.
  37. Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Darewicz, B., and Figaszewski, Z.A. (2015) Characterization of human bladder cell membrane during cancer transformation, *J. Membr. Biol.*, **248**, 301–307.
  38. Baenke, F., Peck, B., Miess, A. and Schulze, A. (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development, *Dis. Models Mech.*, **6**, 1353–1363.
  39. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., and Farese, R.V. (2013) Cellular fatty acid metabolism and cancer, *Cell Metab.*, **6**, 153–161.
  40. Zhao, J., Zhou, Q., Wiedmer, T., and Sims, P.J. (1998) Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface, *J. Biol. Chem.*, **273**, 6603–6606.
  41. Ran, S., Downes, A., and Thorpe, P.E. (2002) Increased exposure of anion phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res.*, **62**, 6132–6140.
  42. Stafford, J.H., and Thorpe, P.E. (2011) Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium, *Neoplasia*, **13**, 299–308.
  43. Turk, H.F., and Chapkin, R.S. (2013) Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **88**, 43–47.
  44. Sakai, M., Kakutani, S., Horikawa, Ch., Tokuda, H., Kawashima, H., Shibata, H., Okubo, H., and Sasaki, S. (2012) Arachidonic acid and cancer risk: systematic review of observational studies, *BMC Cancer.*, **12**, 606–633.

## CHANGES IN LIPID COMPOSITION OF BIOLOGICAL MEMBRANES CAUSED BY ENDOGENOUS AND EXOGENOUS FACTORS

**B. Szachowicz-Petelska**

*Institute of Chemistry, University in Białystok, Ciołkowskiego 1K,  
15-245 Białystok, Poland; E-mail: basia@uwb.edu.pl*

Received December 15, 2017

Revision received August 21, 2018

Accepted August 21, 2018

Quantitative and qualitative assessments of membrane components are essential for accurate interpretation of processes occurring in biological membranes. Significant impact on the structure and function of cell membranes is imposed by an oxidative stress. Oxidative stress induced by chronic ethanol consumption and by malignant transformation has been implicated in changes in the levels of cell membrane phospholipids and fatty acids. In this paper, we used high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantitate the effects of alcohol and malignant transformation on membrane components, namely phospholipids and free fatty acids. Ethanol intragastric introduction to Wistar rats for 4 weeks with a gradual dose increase (from 2 to 6 g/kg body weight) elevated phospholipid levels in liver cell membranes. Comparative analysis of phospholipid and fatty acid compositions in cell membranes isolated from the colorectal cancer tissue and normal colon mucosa of patients with colorectal cancer showed that malignant transformation was accompanied by an increase in phospholipid levels as well as by a decrease in level of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids, while levels of arachidonic and oleic acids were increased. The discussion of the obtained results is focused on explaining how the changes in phospholipid and fatty acid levels affect the state of cell membranes and cell function.

*Keywords:* phospholipids, free fatty acids, ethanol, cancer