

УДК 576 314+616 379 008 64 092 9-07 616-008 615.781

Академик НАН Армении К. Г. Карагезян, А. А. Оганесян,
Р. Л. Данилова, Л. М. Овсепян, М. К. Карагезян

**Нарушения состава и содержания фосфолипидов в мембранах
митохондрий печени белых крыс при галотановом наркозе
и нормализующее влияние тиосульфата натрия на этом фоне**

(Представлено 26/VII 1996)

Применение галотана (Г) в хирургической практике в качестве эффективного наркотического средства (2-бromo-3-хлоро-1,1,1-трифлюороэтан) с определенной степенью токсичности (1) вызывает интерес к изучению особенностей его действия, интенсивности течения реакций свободнорадикального окисления (СРО) липидов и резистентности мембран эритроцитов к перекисному гемолизу (2).

Исходя из вышеизложенного мы занялись изучением особенностей нарушений молекулярных механизмов фосфолипидов (ФЛ) под действием Г в интактных митохондриях (ИМ) гепатоцитов белых крыс, в их наружных и внутренних мембранах (НММ и ВММ соответственно), а также характера влияния на фоне действия Г тиосульфата натрия (ТСН) (3), обладающего выраженными антиоксидантными свойствами (4), наподобие мембранопротекторного действия альфа-токоферола и глутатиона (5), направленного на поддержание филогенетически запрограммированного постоянства качественно-количественных соотношений мембранных ФЛ (6), малейшие отклонения которых чреваты развитием мембранотоксического, мембранолитического эффектов, стартированием и генерализацией болезненных явлений.

Опыты проводили на 60 беспородных белых крысах-самцах, массой 180-200 г, содержащихся на ординарном пищевом режиме вивария и подразделенных на следующие 4 экспериментальные группы (по 15 животных в каждой): 1) контроль; 2) подвергнутые 30 мин действию Г, с концентрацией его во вдыхаемом O_2 в пределах 1-1,5 объемных %; 3) то же, что и в пункте 2, спустя 30 мин после предшествовавшего внутрибрюшинного введения 35%-ного раствора ТСН в количестве 1 мл; 4) то же, что и в пункте 2, с последующим введением ТСН в указанной концентрации в количестве 0,15 мл. Спустя 60 мин после завершающей манипуляции животных забивали обезглавливанием, изолированные на

холоде кусочки печени гомогенизировали в среде 0,25М сахарозы и 0,01М Трис-НСI-буфера, рН 7,4, суспензию центрифугировали для получения субклеточных образований (центрифуга VAC-601, ГДР). Образовавшуюся фракцию ИМ промывали смесью сахарозы Трис-НСI буфера и подвергали трехкратному центрифугированию: при 600 g 10 мин и дважды при 8500 g 19 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок заливали 25 мл охлажденной дистиллированной водой (осмотический шок) и оставляли в холодильнике на 24 ч для отделения мембран. НММ и ВММ изолировали в градиенте плотности 34, 44 и 52% растворов сахарозы, приготовленных на Трис-НСI буфере и последовательно наложенных в нисходящей концентрации (52, 44, 34%) в объеме 8-10 мл (первые два раствора) и 6-8 мл (третий раствор) на заранее налитые в центрифужные пробирки суспензии в количестве 5-7 мл. Центрифугирование проводили с использованием бакет-ротора при 45000 g в течение 60 мин, фракция НММ обнаруживалась в градиенте между слоями растворов сахарозы с концентрацией 34 и 44%, а фракция ВММ располагалась в градиенте между слоями растворов сахарозы с концентрацией 44 и 52%. Изолированные отсасыванием с помощью шприца фракции митохондриальных мембран осаждали центрифугированием описанным способом, а степень их чистоты контролировали электронно-микроскопически.

Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (марка адсорбента КСК) с использованием системы растворителей: хлороформ-метанол-аммиак 65:35:5 объемных единиц, а идентификацию их – с помощью соответствующих свидетелей фирмы "Sigma" (США). Минерализацию липидного фосфора ФЛ осуществляли в среде 72%-ного раствора хлорной кислоты. Количество ФЛ выражали в мкг неорганического фосфора/мг сухого остатка соответствующей фракции (8).

Активность процесса СРО липидов определяли по выходу малонового диальдегида (МДА), образующего с тиобарбитуровой кислотой цветное окрашивание, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически (аппарат СФ-4А) при 535 нм (9), пересчетом содержания МДА/мг общего белка данной фракции (10).

Результаты исследований, отраженные в табл 1, свидетельствуют о существенных отклонениях под действием Г содержания всех исследованных фракций ФЛ ИМ гепатоцитов, НММ, ВММ. Наиболее демонстративными представляются сдвиги уровней фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) и фосфатидилсеринов (ФС). Обратимые взаимопревращения этих ФЛ при Г наркозе выражаются в статистически достоверном уменьшении количества ФХ и параллельно развивающемся как возрастании содержания ФЭ, так и понижении ФС в ИМ и НММ. Вместе с тем бросается в глаза ярко выраженное возрастание содержания ФС, монофосфоинозитидов (МФИ) и кардиолипинов (КЛ) в ВММ, что следует интерпретировать важностью роли

указанных ФЛ в достижении эффекта стимулирования дыхательной функции митохондрий. Это особенно необходимо при Г наркозе, характеризующемся трансформацией определенной части ФХ в лизофосфатидилхолины (ЛФХ), обладающие мембранотоксическим эффектом. Следовательно, отмеченное выше увеличение уровня кислых ФЛ (КФЛ) и их суммы (СКФЛ), направленное на поддержание дыхательной функции ИМ и ВММ, оказывается намного демонстративнее по сравнению со сдвигами содержания как отдельных нейтральных ФЛ (НФЛ), так и их суммы (СНФЛ), о чем свидетельствует заметное уменьшение при действии Г величины коэффициента К – отношения СНФЛ и СКФЛ, установленное в ВММ в пределах 1,18 против 1,80 в контроле.

Как явствует из данных, отраженных в табл.2, введение ТСН животным с 30-минутным Г наркозом сопровождается проявлением ярко выраженного детоксицирующего эффекта. Это выражается в заметном ингибировании активности фосфолипазы А₂ с заметным уменьшением выхода ЛФХ во ВММ, ИМ и НММ. По степени своей выраженности уровень ЛФХ намного уступает тому, что отмечается при неприменении ТСН, сопровождаясь весьма незначительными изменениями уровней МФИ, ФС и КЛ, устанавливающихся в пределах контрольных величин. Это естественным образом приближает СНФЛ, СКФЛ и К к нормальным показателям, продолжающим, тем не менее, демонстрировать статистически достоверные расхождения с контролем.

Введение животным ТСН за 30 мин до дачи Г, согласно данным табл.3, оказывается несравненно более эффективным в поддержании характерного для нормы уровня метаболизма ФЛ в ИМ, НММ и ВММ, с соответствующим отклонением в них суммы ФЛ (СФЛ), СНФЛ, СКФЛ и К.

Таким образом, Г, вызывая деацилирование ФХ с выходом высоких концентраций ЛФХ, способствует также образованию большого пула неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) полиенового ряда, активно вовлекающихся в реакции СРО липидов в качестве субстратов для образования больших количеств продуктов их переокисления, как об этом свидетельствуют данные, отраженные в табл.4. Все они – ЛФХ, НЭЖК и липидные перекиси в триаде мощных вредоносных факторов выступают в качестве одних из основных патогенетических факторов токсического действия Г.

Согласно нашим наблюдениям как в сериях по изучению динамики количественных изменений ФЛ, так и в данном случае нормализующее действие ТСН проявляется наиболее демонстративно, если оно предшествует введению в организм Г. При этом отмечающиеся в содержании липидных перекисей отклонения во всех исследованных биологических системах оказываются статистически недостоверными.

Таблица 1

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухой фракции) в интактных митохондриях (1), их наружных (2) и внутренних (3) мембранах в контроле (А) и на фоне 30-минутного галотанового наркоза (Б)

Показатели	1			2			3		
	А	Б	P<	А	Б	P<	А	Б	P<
Монофосфоинозитиды	1,29±0,09	2,51±0,08	0,001	1,26±0,06	0,80±0,02	0,001	1,19±0,06	2,08±0,20	0,001
Лизофосфатидилхолины	1,19±0,03	2,79±0,04	0,001	1,49±0,09	2,56±0,09	0,001	0,91±0,02	2,08±0,13	0,001
Сфингомиелины	2,18±0,08	2,89±0,07	0,01	2,23±0,01	1,03±0,09	0,001	1,23±0,05	2,41±0,21	0,001
Фосфатидилхолины	4,98±0,11	3,13±0,12	0,01	3,73±0,15	1,39±0,09	0,001	4,99±0,09	4,09±0,14	0,001
Фосфатидилсерины	1,83±0,12	0,78±0,08	0,001	1,99±0,06	0,96±0,05	0,01	1,31±0,04	3,93±0,15	0,001
Фосфатидилэтанолламины	2,22±0,06	4,91±0,07	0,001	1,11±0,08	2,46±0,04	0,02	2,11±0,13	3,69±0,19	0,001
Кардиолипиды	2,73±0,13	3,99±0,12	0,01	1,61±0,10	1,07±0,09	0,005	2,44±0,13	4,41±0,25	0,001
СФЛ	15,93±0,22	21,00±0,25	0,001	13,42±0,23	10,27±0,21	0,001	14,18±0,27	22,69±0,28	0,001
СНФЛ	10,51±0,12	13,72±0,14	0,001	8,56±0,12	7,44±0,17	0,001	9,24±0,14	12,27±0,23	0,001
СКФЛ	5,42±0,11	7,28±0,09	0,001	4,86±0,13	2,83±0,14	0,001	4,94±0,15	10,42±0,17	0,001
К	1,93±0,03	1,88±0,04	0,01	0,76±0,03	2,6±0,05	0,001	1,80±0,03	1,18±0,05	0,001

Примечание: А – n=15, Б – n=15

Таблица 2

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухой фракции) в интактных митохондриях (1) гепатоцитов белых крыс, их наружных (2) и внутренних (3) мембранах в контроле (А) и спустя 30 мин после введения тиосульфата натрия на фоне галотанового наркоза (Б)

Показатели	1			2			3		
	А	Б	P<	А	Б	P<	А	Б	P<
Монофосфоинозитиды	1,29±0,09	1,33±0,10	0,5	1,26±0,06	1,23±0,03	0,5	1,19±0,06	1,21±0,06	0,1
Лизофосфатидилхолины	1,19±0,03	2,00±0,07	0,001	1,49±0,09	1,67±0,08	0,001	1,91±0,02	0,99±0,04	0,001
Сфингомиелины	2,17±0,08	2,11±0,09	0,5	2,23±0,01	2,24±0,03	0,5	1,23±0,05	1,25±0,06	0,01
Фосфатидилхолины	4,98±0,11	3,79±0,10	0,001	3,79±0,15	3,15±0,17	0,001	4,99±0,08	4,80±0,09	0,001
Фосфатидилсерины	3,78±0,12	3,71±0,14	0,5	1,99±0,06	1,93±0,07	0,01	1,31±0,04	1,53±0,06	0,001
Фосфатидилэтаноламины	2,22±0,06	2,09±0,08	0,5	1,11±0,08	1,13±0,06	0,5	2,11±0,13	2,13±0,12	0,5
Кардиолипиды	2,73±0,13	2,51±0,12	0,01	1,61±0,10	1,41±0,05	0,5	2,44±0,13	2,49±0,14	0,5
СФЛ	17,88±0,32	17,54±0,31	0,1	13,42±0,34	12,76±0,56	0,1	14,18±0,90	13,19±0,67	0,5
СНФЛ	10,51±0,12	9,99±0,13	0,001	8,56±0,33	8,56±0,33	0,5	9,24±0,14	9,17±0,20	0,5
СКФЛ	7,37±0,11	7,55±0,11	0,01	4,86±0,12	4,57±0,51	0,5	4,94±0,12	4,02±0,14	0,001
К	1,43±0,03	1,32±0,04	0,001	1,76±0,03	1,79±0,03	0,001	1,87±0,03	2,28±0,04	0,001

Примечание: А – n=15, Б – n=15

Таблица 3

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухой фракции) в интактных митохондриях (1) гепатоцитов белых крыс, их наружных (2) и внутренних (3) мембранах в контроле (А) и на фоне 30-минутного галотанового наркоза, выработанного спустя 30 мин после предварительного введения тиосульфата натрия

Показатели	1			2			3		
	А	Б	P<	А	Б	P<	А	Б	P<
Монофосфоинозитиды	1,29±0,09	1,31±0,09	0,5	1,26±0,06	1,25±0,04	0,5	1,19±0,06	1,18±0,07	0,5
Лизофосфатидилхолины	1,19±0,05	1,26±0,07	0,001	1,49±0,09	1,51±0,09	0,5	0,91±0,02	0,89±0,04	0,5
Сфингомиелины	2,17±0,08	2,13±0,08	0,5	2,23±0,08	2,20±0,08	0,1	1,23±0,05	1,22±0,07	0,5
Фосфатидилхолины	4,98±0,11	4,81±0,13	0,01	3,73±0,15	3,68±0,22	0,5	4,99±0,08	4,92±0,13	0,01
Фосфатидилсерины	3,78±0,12	3,69±0,14	0,1	1,99±0,06	1,97±0,07	0,5	1,31±0,04	1,29±0,08	0,5
Фосфатидилэтанолламины	2,22±0,06	2,25±0,09	0,1	1,11±0,03	1,09±0,09	0,5	2,11±0,13	2,08±0,15	0,5
Кардиолипины	2,73±0,13	2,71±0,16	0,5	1,61±0,10	1,58±0,11	0,5	2,44±0,13	2,39±0,12	0,5
СФЛ	17,88±0,32	18,18±0,41	0,5	13,42±0,34	13,28±0,29	0,5	14,18±0,90	13,96±0,99	0,5
СНФЛ	10,51±0,12	10,47±0,14	0,5	8,56±0,33	8,48±0,38	0,5	9,24±0,14	9,10±0,15	0,5
СКФЛ	7,37±0,11	7,71±0,12	0,001	4,86±0,12	4,80±0,13	0,5	4,94±0,12	4,86±0,13	0,5
К	1,43±0,03	1,35±0,03	0,001	1,76±0,02	1,76±0,03	0,5	1,87±0,03	1,87±0,03	0,5

Примечание: А – n=15, Б – n=15

Таблица 4

Динамика количественных изменений продуктов свободнорадикального окисления липидов (в нМ малонового диальдегида/мг белка) в интактных митохондриях (1) гепатоцитов белых крыс, их наружных (2) и внутренних (3) мембранах в контроле (А), спустя 30 мин после введения тиосульфата натрия на фоне галотанового наркоза (Б) и на фоне 30-минутного галотанового наркоза, выработанного спустя 30 мин после предварительного введения тиосульфата натрия (В)

Показатели	1			2			3		
	А	Б	P<	А	Б	P<	А	Б	P<
Неферментативное перекисление	11,81±1,13	20,35±1,03	0,001	8,46±0,97	17,58±1,13	0,001	6,12±0,97	8,99±0,75	0,01
Ферментативное перекисление	9,88±1,03	15,89±1,30	0,001	5,92±0,85	9,98±0,71	0,001	5,99±1,30	7,28±0,98	0,01
	А	В	P<	А	В	P<	А	В	P<
Неферментативное перекисление	12,00±1,13	12,04±1,01	0,5	8,46±0,97	8,39±0,88	0,5	6,12±0,97	6,66±0,91	0,5
Ферментативное перекисление	9,88±1,03	10,12±1,14	0,5	5,92±0,81	6,22±0,81	0,5	5,99±1,30	6,76±1,19	0,5

Примечание: обозначения А и Б те же, что и в табл.1; В – n=15

Вышеизложенное намечает новые подходы для более обстоятельного изучения в дальнейшем молекулярных механизмов токсического действия Г на организм больных, направляемых на хирургическое лечение, а также выявления особенностей благотворного эффекта ТСН как после, так и до выработки Г наркоза.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ереванский государственный медицинский университет МЗ РА Армении

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ, Ա. Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ.

Ռ. Լ. ԴԱՆԻՆՈՎԱ, Լ. Մ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Կ. Մ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

Սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիումների թաղանթների ֆոսֆոլիպիդների որակական և քանակական փոփոխությունները հիսլոտանային նարկոզի ժամանակ և նատրիումի թիոսուլֆատի կանոնավորիչ ազդեցությունը

Ցույց է տրված, որ Հայտանի 30-րոպեանոց ազդեցության ներքո սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիոմների արտաքին և ներքին թաղանթներում տեղի են ունենում թթու, չեզոք ֆոսֆոլիպիդների խիստ արտաՀայտված քանակական փոփոխություններ. ինչպես նաև ազատ ռադիկալային ռեակցիաների վառ արտաՀայտված ակտիվացում:

Նատրիումի թիոսուլֆատի ազդեցության ներքո տեղի է ունենում նշված խանգարումների նորմալացում:

ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ H.F.Galley, L.R.Nelson, N.R.Webster, Brit.J Anesthes, v.75, №3, p 326-329 (1955).
- ² M.Rahman, K.Fujii, M.Sato e.a., J Appl.Toxicol., v.14, №1, p 43-46 (1994). ³ К.Г.Карагезян, Ю.В.Тадевосян, Т.Б.Батикян, ДАН СССР, т.286, №2, с.465-467 (1985).
- ⁴ А.Г.Бадалян, Диагностическая ценность показателей инсулярной, контринсулярной систем, активности органоспецифических ферментов и лечебная активность тиосульфата при хронических заболеваниях печени. Канд.дис., Ереван, 1996 ⁵ M.Sato, K.Fujii, O.Yugge, Hiroshima J.Med.Sci., v.39, №1, p.1-6 (1990). ⁶ Е.М.Крепс, Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981. ⁷ А.И.Арчаков, В.М.Девиченский, Биохимия, т.33, с 479 (1968). ⁸ G.R.Bartlet e.a, J Biol.Chem., v.234, p 466 (1959). ⁹ Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972. ¹⁰ O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.J.Tarr, J Biol.Chem., v.193, p.265 (1951).