

УДК 546.185+616-056.49

А. А. Казинян

Особенности изменений фосфолипидов  
митохондриальной фракции печени белых крыс при  
двусторонней поддиафрагмальной ваготомии

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 12/VII 1999)

В настоящем исследовании выявлены особенности качественных и количественных изменений состава фосфолипидов (ФЛ) митохондриальной фракции печени белых крыс в разные сроки после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии. Наблюдаемые сдвиги свидетельствуют о возможных изменениях митохондрий в виде их набухания, исчезновения крист, разрыва внутренних и наружных мембран, структурная организация и функциональная активность которых обусловлены в физиологически метаболизирующей биологической системе филогенетически сложившимся в ней постоянством фосфолипид-фосфолипидных соотношений.

Полученные результаты способствуют выявлению и изучению особенностей формирования тонких молекулярных механизмов нервной регуляции тканевого обмена, имеющих важное значение в разрешении ряда кардинальных положений современной трансплантологии и осмыслении сути неврэктомии как перспективно хирургического метода лечения многих недугов пищеварительного тракта.

Исследования были проведены на 122 белых крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в обычных условиях вивария.

Через операционную рану, образованную срединным разрезом брюшной стенки в области нижнего отдела пищевода, производили перерезку левой и правой ветвей обоих блуждающих нервов с удалением их на протяжении 2 мм. Выделение митохондриальной фракции производили известным классическим методом [1]. Экстракцию ФЛ из митохондриальной фракции осуществляли в модификации К. Г. Карагезяна [2]. Для этого к митохондриальной массе в фарфоровой ступке неоднократно приливали по 3-4 мл высокоочищенного повторным дистиллированием ацетона. Процедуру тщательного растирания содержимого ступки пестиком и выпаривания его жидкой фракции каждый раз проводили под током холодного воздуха, нагнетаемого с помощью фена (аппарата для сушки волос); в конечном счете она приводила к образованию ацетонового порошка митохондриальной фракции. Экстракцию ФЛ производили 3-кратной экстракцией их с помощью хлороформ-метаноловой смеси в соотношениях (1:2), (1:1) и (2:10). Объединенные экстракты промывали 0,025 Н раствором HCl или физиологическим раствором с целью удаления следов неорганического фосфата и прочих водорастворимых примесей. Смесь ФЛ выпаривали под током газообразного азота насухо. К остатку добавляли 1-2 мл хлороформа, после чего объем наносимого для хроматографии экстракта варьировали в пределах количеств, содержащих не более 8-10 мкг липидного фосфора.

Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли с помощью одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля марки КСК в системе растворителей хлороформ-метанол-аммиак (65:35:5). Идентификацию пятен ФЛ проводили в атмосфере, насыщенной парами йода.

Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот в песочной бане при 180-200°С с последующим пересчетом содержания ФЛ в мкг липидного фосфора на 1 мг сухого остатка [3].

Статистическую обработку полученных результатов производили общеизвестным методом Стьюдента-Фишера.

Результаты проведенных исследований, отраженные в таблице, показывают, что в ранние сроки после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии (1, 3 и 7 сутки) происходит заметное уменьшение суммарных ФЛ (-26,2, -24,3 и -23,3% соответственно), а также их отдельных представителей, в частности, фосфатидилхолинов (ФХ) - (-50,0, -53,8 и -46,2% соответственно), фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) - (-33,3, -26,7 и -20,0% соответственно), фосфатидилсе-ринов (ФС) - (-38,5, -30,8 и -15,4% соответственно) и суммы фосфатидных кислот и кардиолипинов (ФК+КЛ) - (-42,1%) в указанные сроки наблюдения. При этом отмечалось резкое увеличение содержания лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) - (+100,0, +100,0 и +85,7% соответственно), что мы склонны объяснить возрастанием активности фосфолипазы A<sub>2</sub>, приводящим к интенсивно совершающемуся деацилированию ненасыщенных жирных кислот с активным вовлечением их в реакции свободнорадикального окисления, продукты перекисления которых, наряду с возросшим количеством ЛФХ, выступают в роли мощных агентов токсического и литического действия, проявляющегося на уровне митохондриальных мембран, в частности, в виде подавления активности мембраносвязанных липидзависимых ферментных систем.

Динамика количественных изменений фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/на мг сухого остатка)  
митохондриальной фракции печени белых крыс в контроле (К)  
в различные сроки после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии

| Показатели                               | <i>K</i><br><i>n</i> =14 | 1 день<br><i>n</i> =16 | %<br>разницы<br>от <i>K</i> | 3 день<br><i>n</i> =20 | %<br>разницы<br>от <i>K</i> | 7 день<br><i>n</i> =26 | %<br>разницы<br>от <i>K</i> | 30 день<br><i>n</i> =22 | %<br>разницы<br>от <i>K</i> | 90 день<br><i>n</i> =24 | %<br>разницы<br>от <i>K</i> |
|------------------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Монофосфоинозитиды                       | 0.9±0.06                 | 0.70±0.04 <sup>a</sup> | -22.2                       | 0.80±0.06 <sup>a</sup> | -11.1                       | 0.70±0.04 <sup>a</sup> | -22.2                       | 0.70±0.03 <sup>a</sup>  | -22.2                       | 0.80±0.04 <sup>a</sup>  | -11.1                       |
| Лизофосфатидилхолины                     | 0.7±0.05                 | 1.40±0.5 <sup>a</sup>  | +100.0                      | 1.40±0.07 <sup>a</sup> | +100.0                      | 1.30±0.07 <sup>a</sup> | +85.7                       | 1.00±0.08 <sup>a</sup>  | +42.9                       | 0.80±0.07 <sup>a</sup>  | +14.3                       |
| Сфингомиелины                            | 1.4±0.06                 | 1.30±0.07 <sup>a</sup> | -7.1                        | 1.30±0.04 <sup>a</sup> | -7.1                        | 1.10±0.04 <sup>a</sup> | -21.4                       | 1.30±0.09 <sup>a</sup>  | -7.1                        | 1.30±0.12 <sup>a</sup>  | -7.1                        |
| Фосфатидилхолины                         | 2.6±0.22                 | 1.30±0.06 <sup>a</sup> | -50.0                       | 1.20±0.09 <sup>a</sup> | -53.8                       | 1.40±0.09 <sup>a</sup> | -46.2                       | 1.60±0.10 <sup>a</sup>  | -38.5                       | 1.90±0.17 <sup>a</sup>  | -26.9                       |
| Фосфатидилсерины                         | 1.3±0.11                 | 0.08±0.09 <sup>a</sup> | -38.5                       | 0.90±0.09 <sup>a</sup> | -30.8                       | 1.10±0.11 <sup>a</sup> | -15.4                       | 1.70±0.10 <sup>a</sup>  | +30.8                       | 1.70±0.09 <sup>a</sup>  | +30.8                       |
| Фосфатидилэтаноламины                    | 1.5±0.10                 | 1.00±0.09 <sup>a</sup> | -33.3                       | 1.10±0.09 <sup>a</sup> | -26.7                       | 1.20±0.08 <sup>d</sup> | -20.0                       | 1.40±0.10 <sup>a</sup>  | -6.6                        | 1.20±0.08 <sup>a</sup>  | -20.0                       |
| Фосфатидные кислоты +<br>кардиолипины    | 1.9±0.11                 | 1.10±0.09 <sup>a</sup> | -42.1                       | 1.10±0.13 <sup>a</sup> | -42.1                       | 1.10±0.08 <sup>a</sup> | -42.1                       | 1.40±0.12 <sup>a</sup>  | -26.3                       | 1.80±0.09 <sup>a</sup>  | -5.3                        |
| Сумма нейтральных<br>фосфолипидов (СНФЛ) | 6.2±0.43                 | 5.00±0.27 <sup>a</sup> | -19.4                       | 5.00±0.09 <sup>a</sup> | -19.4                       | 5.00±0.28 <sup>a</sup> | -19.4                       | 5.30±0.37 <sup>b</sup>  | -14.5                       | 5.20±0.44 <sup>c</sup>  | -16.1                       |
| Сумма кислых                             | 4.1±0.28                 | 2.60±0.22 <sup>a</sup> | -36.6                       | 2.80±0.28 <sup>a</sup> | -31.7                       | 2.90±0.22 <sup>a</sup> | -29.3                       | 3.80±0.25 <sup>d</sup>  | -7.3                        | 4.30±0.22 <sup>c</sup>  | +4.9                        |

|                     |           |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |
|---------------------|-----------|------------------------|-------|------------------------|-------|------------------------|-------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| фосфолипидов (СКФЛ) |           |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |
| Сумма фосфолипидов  | 10.3±0.71 | 7.60±0.49 <sup>b</sup> | -26.2 | 7.80±0.57 <sup>a</sup> | -24.3 | 7.90±0.51 <sup>a</sup> | -23.3 | 9.10±0.62 <sup>d</sup> | -11.7 | 9.50±0.66 <sup>c</sup> | -7.8  |
| Коэффициент         | 1.5±0.03  | 1.92±0.02 <sup>a</sup> | +27.1 | 1.79±0.03 <sup>a</sup> | +18.5 | 1.72±0.03 <sup>a</sup> | +13.9 | 13.9±0.03 <sup>a</sup> | -8.0  | 1.21±0.03 <sup>a</sup> | -20.0 |
| СНФЛ/СКФЛ           |           |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |                        |       |

Примечание: *a-P* < 0.001; *b-P* < 0.01; *c-P* < 0.002; *d-P* < 0.05 .

В связи с вышеизложенным существенный интерес представляет изменение соотношений сумм нейтральных и кислых ФЛ (СНФЛ/СКФЛ), относительное повышение которых свидетельствует об интенсификации реакций катаболизма ФЛ, что также чревато развитием деструктивных превращений в мембранах митохондрий. Расстройство кооперирования фосфатидилхолинового цикла, связанное преимущественно с уменьшением количества ФХ и увеличением содержания ЛФХ, а также с интенсификацией процессов деацилирования и реацилирования ФЛ, свидетельствует о глубине срывов физико-химических свойств ФЛ, падении темпа их обменяемости и подавлении систем антирадикальной защиты как митохондрий, так и печеночных клеток в целом.

В более поздние сроки ваготомии (30 и 90 сутки) обнаруживается постепенное возрастание количества ФС, оказывающегося выше контрольного уровня (в обоих случаях +30,8%), что может быть обусловлено подавлением активности сериндекарбоксилазы в реакции трансформации ФС в ФЭ и, наоборот, интенсификации противоположно направленного процесса. Уменьшение коэффициента СНФЛ/СКФЛ по сравнению с контрольным говорит о повышении темпа обменяемости ФЛ и стремлении к нормализации их метаболизма. Однако уменьшение содержания ФХ и продолжающееся увеличение количества ЛФХ указывают на имеющие место срывы обменных процессов ФЛ митохондриальной фракции и неполное восстановление их биосинтетических реакций, подтверждая тем самым важную роль ВНЦ в регуляции структурной организации и функциональной активности субклеточных элементов и клеток различных органов и систем.

Согласно литературе последних лет, расстройства статуса ФЛ-ФЛ соотношений в митохондриях чреваты резким нарушением активности цитохромной системы, катализирующей электронтранспортирующие механизмы на уровне внутренних мембран этих образований. С отмеченной точки зрения особый интерес представляют, в первую очередь, КЛ [4], затем ФЭ [5] и, наконец, ФХ [6], уровень которых, согласно нашим наблюдениям, претерпевает существенный спад в митохондриальной фракции гепатоцитов в условиях ваготомии. По всей вероятности, аналогичным образом следует интерпретировать отрицательное воздействие выключения парасимпатического звена ВНС на активность плазматических мембран гепатоцитов и их митохондриальных образований. Стимулирующее воздействие ФХ, КЛ, а также ФС на функциональную активность Na<sup>+</sup>, Кa<sup>+</sup> - АТФаз [7] в условиях нашего эксперимента, естественно, оказывается далеко не совершенным, поскольку, как уже отмечалось, содержание этих липидов заметно убывало. В отмеченном плане следует обратить особое внимание и на то, что прослеженная при ваготомии убыль содержания ФХ и ФЭ, отрицательно отражающаяся на активности пируватоксидазы [8], Mg<sup>2+</sup>- АТФазы [9], а КЛ - на функциональное состояние сукцинатдегидрогеназы, NADH - дегидрогеназы [10] и глутаматдегидрогеназы, в конечном счете приводит к резкому извращению статуса клеточной активности в целом. Это подчеркивает значение ВНС в обеспечении физиологичности и бесперебойности течения тонких биохимических и молекулярно-биологических превращений в общей канве компенсаторно-приспособительных механизмов организма как основного залога в достижении высокой степени терапевтической эффективности.

Институт молекулярной биологии НАН РА.

Литература

1. Johnson D., Lardy H.- Methods in enzymology. N. Y. 1967. V. 10. P. 94-102.  
2. Карагезян К. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван: Айастан. 1972. 267с.  
3. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований. Липиды и энергетический обмен. Учебное пособие. Изд-во ЛГУ. 1982. С.101.  
4. Brierley G. P., Morola Aj.- Biochim.et biophys. acta. 1962. V. 64. P. 205-217.  
5. Каган В. Е., Азизова О. А., Архипенко Ю. В.- Биофизика. 1977. Т. 22. N 4. С. 625-630.  
6. Fleisher S., Casu A.- Biophys. Res. Communs. 1966. V. 24. N 2. P. 189-194.  
7. Coleman R.- Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 300. N 1. P. 1-30.  
8. Cunningham C. C., Hager L. P.- J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 1575-1582.  
9. Peter H. W., Wiese F., Graszynski K.- J. Develop. Biol. 1975. V. 46. N 2. P. 439-445.  
10. Микельсаар Х., Северина И. С., Скулачев А. П.- Усп. совр. биологии. 1974. Т. 78. N 3(6). С. 348-385.

**Ա. Ա. Ղազինյան**  
**Սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի**  
**ֆոսֆոլիպիդների փոփոխությունների առանձնահատկությունները**  
**երկկողմանի ենթաստոծանիական վագոտոմիայի պայմաններում**

Տվյալ հետազոտության արդյունքներում արծարծված են սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի որակական և քանակական փոփոխությունները երկկողմանի ենթածորանի վագոտոմիայից հետո տարբեր ժամկետներում (1, 3, 7, 30, 90 օր անց): Ստացված տվյալները վկայում են միտոքոնդրիումներում կատարվող կառուցվածքային խախտումների մասին (ուռճեցում, կրիստների անհետացում, ներքին և արտաքին թաղանթների քայքայում), որոնք պայմանավորված են մասնավորապես ֆիլոգենետիկորեն կայունացած ֆոսֆոլիպիդ-ֆոսֆոլիպիդային փոխհարաբերության խախտումներով: Ստացված արդյունքները լույս են սփռում հյուսվածքային փոխանակության կանոնավորման մեջ նյարդային մեխանիզմների նուրբ մոլեկուլային ձևավորումների առանձնահատկությունների ուսումնասիրության վրա: Այս հետազոտությունները լուրջ հետաքրքրություն են առաջացնում ժամանակակից տրանսպլանտալոգիայի պարզաբանման և ներեկտոմիայի իմաստավորման բնագավառներում, հանդիսանալով ադեստամոքսային համակարգի մի շարք հիվանդությունների հեռանկարային վիրաբուժական մեթոդ: