

УДК 616.127:615.356

А. Н. ГРЕКУЛОВА, Н. А. КУРДИАНИ

## ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА СОБАК ПРИ ПЕРЕГРУЗКЕ СЕРДЦА

Внутримышечное введение витамина Е в условиях перегрузки сердца, нормализуя активность фосфолипазы  $A_2$  и перекисное окисление липидов, повышает содержание общего фосфора фосфолипидов в митохондриях мышцы сердца собак за счет увеличения фракций фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов.

Известно, что интенсификация перекисного окисления липидов играет важную роль в возникновении ряда патологических состояний [10]. Липидные перекиси ведут к повреждениям мембранных структур [4, 9], зачастую необратимым, так как, являясь агрессивными соединениями, вызывают перекисидацию тканевых липидов и инактивацию  $\alpha$ -токоферола [1].

Витамин Е, обладая противоокислительным действием, играет роль природных антиоксидантов и, стабилизируя мембранную структуру [15], защищает митохондрии клеток от окисления. Имеются данные, согласно которым витамин Е оказывает благоприятное действие в начальных стадиях развития гипертонии [12], при общем атеросклерозе [13], ревматических заболеваниях сердца [19] и др.

Интересны данные о положительном влиянии предварительного введения  $\alpha$ -токоферола на состояние митохондрий ткани печени крыс при гипоксии [2, 8, 17] и ишемии почек [15].

В настоящем сообщении представлены результаты изучения влияния витамина Е на функциональное состояние митохондрий мышцы сердца собак при перегрузке сердца. В качестве показателей, характеризующих функциональное состояние митохондрий, исследованы содержание фосфора суммарных фосфолипидов и их спектр, активность фосфолипазы  $A_2$ , гидролизующей фонд эндогенных фосфолипидов митохондрий, образование липидных перекисей (по накоплению малонового диальдегида—специфического продукта распада перекисей жирных кислот), а также эндогенное содержание витамина Е в митохондриях.

### Материалы и методы

Перегрузку сердца создавали путем наложения лигатуры на восходящую ветвь аорты у собак. Через 5 дней после воспроизведения стено-

за аорты собак забивали под наркозом, сердце промывали охлажденным изотоническим раствором КСl. Митохондрии выделяли из левого желудочка сердца методом дифференциального центрифугирования в среде 0,25 М сахарозы-трис-НСl (0,02 М)—версен (0,001 М), рН 7,4.

Критерием чистоты получаемых митохондрий служило отсутствие в них маркерного микросомального фермента глюкозо-6-фосфатазы [3] и лизосомального фермента  $\beta$ -галактозидазы [22], а также характерной для микросом фракции сфингомиелина.

Спектр фосфолипидов митохондрий миокарда собак определяли методом тонкослойной хроматографии. Экстракцию липидов из митохондрий и отмывание от нелипидных примесей производили по методу Folch [21]. Разделение фракций фосфолипидов в тонком слое силикагеля производили в растворах: хлороформ—метанол—вода (26:9,6:1,5), хлороформ—метанол—25% аммиак (13:5:1).

Разделенные фракции фосфолипидов экстрагировали 1 N НСl в метаноле, экстракт упаривали досуха [6] и в пробах определяли количественно фосфор [20].

Определение фосфолипазы  $A_2$  в митохондриях миокарда собак проводили по методу С. А. Тужилина с соавт. [14].

Витамин Е вводился в виде 5% раствора  $\alpha$ -токоферол-ацетата внутримышечно по 1 мл в день в течение 5 дней.

Переокисление липидов изучали по накоплению малонового диальдегида (МДА) при взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой [4], а эндогенное содержание витамина Е в митохондриях—по методу С. Юденфренда [16].

## Результаты и обсуждение

На основании изучения содержания общих и индивидуальных фосфолипидов митохондрий миокарда собак в норме и при перегрузке сердца (стеноз аорты длительностью 5 дней, табл. 1) выявили снижение общих фосфолипидов на 54,8% в группе 5-дневного стеноза аорты, которое происходило за счет снижения фракций фосфатидилхолинов на 21,9%, фосфатидилэтаноламинов на 19,9% и кардиолипинов на 11,5%. Коэффициент отношения суммы нейтральных фосфолипидов (НФЛ) к сумме кислых фосфолипидов (КФЛ) при перегрузке сердца понижался.

Данные по изучению фосфолипазной активности, малонового диальдегида и эндогенного витамина Е в митохондриях нормальных собак и при перегрузке сердца представлены в табл. 2. Полученные данные указывают на то, что стеноз аорты длительностью 5 дней приводит к росту липидной пероксиляции в митохондриях мышцы сердца собак, о чем свидетельствует повышение МДА, к увеличению активности фосфолипазы  $A_2$  и снижению эндогенного содержания витамина Е.

По данным Vignais [22], фосфолипаза  $A_2$  является Са-зависимой и гидролизует кардиолипин—типичный митохондриальный фосфолипид. Waite [23] отмечал проявление активности фосфолипазы в отношении

фосфатидилэтаноламина. Из распад фосфолипидов мембран митохондрий под влиянием фосфолипазы указывал А. В. Каргаполов [8].

Данные В. Е. Кагана [7] показали, что образование перекисей липидов приводит к ослаблению липид-белковых взаимодействий. Это облегчает выход липидов из мембран, а окисленные фосфолипиды являются более доступными для фосфолипаз.

Таблица 1  
Содержание общих и индивидуальных фосфолипидов (в мкг липидного Р/мг б.) в митохондриях мышцы сердца нормальных собак и при перегрузке сердца

Показатели	Статистические параметры		% от общих фосфолипидов	Стеноз аорты 5 дней, М±m	Разница в мкг Р/мг б.	% разницы от нормы	P
	Норма, М±m						
Общий "Р" фосфолипидов	31,9±1,8 (14)			14,4±1,2 (13)	-17,5	-54,80	<0,001
Фосфатидинозиты	1,9±0,5 (6)	6		1,92±0,4 (5)	+0,02	+0,06	0,5
Фосфатидиисерины	2,1±0,4 (7)	6,58		1,47±0,37 (5)	-0,63	-1,97	0,5
Сфингомиелины	1,44±0,14 (15)	4,5		2,01±0,17 (14)	-0,57	-1,78	0,5
Фосфатидилхолины	11,2±0,8 (15)	35,1		4,2±0,47 (11)	-7,0	-21,9	<0,001
Фосфатидилэтаноламины	9,65±0,5 (15)	30,0		3,33±0,43 (11)	-6,36	-19,9	<0,001
Кардиолипины	5,6±0,35 (11)	17,55		1,93±0,2 (12)	-3,67	-11,5	<0,001
Коэффициент отношения суммы НФЛ/сумме КФЛ	2,32			1,8			

Таблица 2  
Активность фосфолипазы А<sub>2</sub> (ед. Е/мг б.), содержание МДА (наномоль/мг б.) α-токоферола (γ/мг б.) в митохондриях мышцы сердца собак до и после введения витамина Е

Эксперим. группы	Активность фосфолипазы А <sub>2</sub>		Содержание МДА		Содержание витамина Е	
	М±m	P	М±m	P	М±m	P
Контрольная	0,25±0,01 (5)		4,03±0,17 (5)		2,33±0,12 (4)	
Стеноз аорты 5 дней	0,655±0,04 (5)	<0,001	10,78±0,4 (5)	<0,001	0,34±0,02 (4)	<0,001
Стеноз аорты 5 дней + витамин Е	0,288±0,02 (5)	>0,1	3,84±0,13 (5)	>0,5	0,68±0,08 (6)	<0,001

Таким образом, можно считать, что усиление липидной перекисидации и активности фосфолипазы А<sub>2</sub> при перегрузке сердца (5 дней) ведут к снижению фракций фосфолипидов и нарушению мембранных структур и митохондрий.

В ранее опубликованной нами работе [5] также было показано, что интенсивность включения  $P^{32}$  в общие и индивидуальные фосфолипиды митохондрий мышцы сердца крыс изменялась при перегрузке сердца. В группе 5-дневного стеноза аорты интенсивность распада фосфолипидов превалировала над процессами синтеза.

Применение лечебных доз витамина Е сразу после воспроизведения экспериментального стеноза аорты, как видно из табл. 2, нормализует активность фосфолипазы  $A_2$  и содержание МДА в митохондриях мышцы сердца собак, тогда как содержание эндогенного витамина Е, несмотря на его повышение, остается достоверно сниженным в сравнении с данными контрольной группы.

Таблица 3

Содержание общих и индивидуальных фосфолипидов (в мкг липидного Р/мг б.) при перегрузке сердца после введения витамина Е

Показатели	Статистические параметры	Стеноз аорты 5 дней + вит. Е, $M \pm m$	Стеноз аорты 5 дней	Разница в мкг Р/мг б.	% разницы от стеноза аорты 5 дней + вит. Е	Р
Общий „Р“ фосфолипидов		24,1 ± 0,8 (6)	14,4	+9,7	+40,2	<0,001
Фосфатидилинозиты		1,36 ± 0,2	1,92	-0,56	- 2,3	0,5
Фосфатидилсерины		1,92 ± 0,1	1,47	+0,45	+ 1,86	0,5
Сфингомиелины		1,43 ± 0,07	2,01	-0,58	- 2,40	0,5
Фосфатидилхолины		9,15 ± 0,1	4,2	+4,95	+20,5	<0,001
Фосфатидилэтанолламины		7,81 ± 0,46	3,33	+4,48	+18,5	<0,001
Кардиолипины		2,18 ± 0,19	1,93	+0,25	+ 1,03	0,5
Коэф. суммы НФЛ/сумме КФЛ		3,4	1,8			

Данные спектра фосфолипидов митохондрий после введения витамина Е в группе 5-дневного стеноза аорты представлены в табл. 3: после введения витамина Е в группе 5-дневного стеноза аорты происходит достоверное увеличение фосфора общих фосфолипидов на 40,2%, за счет увеличения фракций фосфатидилхолинов на 20,5% и фосфатидилэтанолламинов на 16,5%. Фракция фосфатидилсеринов, имевшая тенденцию к понижению, восстанавливалась в количестве. Коэффициент отношения суммы нейтральных фосфолипидов к сумме кислых фосфолипидов увеличивался за счет повышения фракций нейтральных фосфолипидов.

Полученные данные показали, что введение витамина Е при перегрузке сердца оказало положительный эффект на мембрану митохондрий сердца собаки, увеличивая содержание общих фосфолипидов и их фракций—фосфатидилхолинов и фосфатидилэтанолламинов. Это дает основание предполагать, что одним из механизмов защитного влияния витамина Е при перегрузке сердца является его участие в регуляции перекисидации липидов и активности фосфолипазы  $A_2$  и вследствие этого в изменении функционального состояния мембран митохондрий при перегрузке сердца.

По-видимому, витамин Е является одним из средств повышения адаптационных возможностей миокарда за счет стабилизации окислительных процессов липидов в мембране митохондрий.

Лаборатория биохимии Института клинической  
и экспериментальной кардиологии, г. Тбилиси

Поступила 23/IX 1980 г.

Ա. Ն. ԳՐԵԿՈՒՎԱ, Ն. Ա. ԿՈՒՐԴԻԱՆԻ

Ե ՎԻՏԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՇՆԵՐԻ ՍՐՏԱՄԿԱՆԻ  
ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻՈՒՄՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿԻ ՎԻՃԱԿԻ ՎՐԱ  
ՍԱՆՐԱՅԵՆՆԵՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ե վիտամինի միջմկանային ներարկումը սրտի ծանրաբեռնվածության պայմաններում (աորոտայի փորձնական նեղացում 5 օրյա տևողությամբ), հրր կանոնավորվում է  $A_2$  ֆոսֆոլիպազայի և լիպիդների շրածնի պերօքսիդային օքսիդացման ակտիվությունը, բարձրացնում է ֆոսֆոլիպիդներում ընդհանուր ֆոսֆորի պարունակությունը շների սրտամկանի միտոքոնդրիաներում 40,2%-ով, ի հաշիվ ֆոսֆատիդիլխոլինների և ֆոսֆատիդիլէթանոլամինների ֆրակցիաների բարձրացման:

A. N. GRECULOVA, N. A. KURDIANI

## INFLUENCE OF VITAMIN E ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE DOG MYOCARDIUM MITOCHONDRIA DURING HEART OVERLOADING

Intramuscular injections of vitamin E during heart overloading (a five days' experimental stenosis of aorta), normalizing the activity of phospholipase  $A_2$  and lipid peroxidation, raise total phospholipid phosphorus content in mitochondria of the dog heart muscle on 40,2% by increasing the fractions of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И., Баджиян С. А., Мхитарян В. Г. Бюлл. exper. биол. и мед., 1979, 5, стр. 422.
2. Айдарханов Б. Б., Синяевский Ю. А., Алдашев А. А. Тезисы III Всесоюзн. симп. АН СССР, АМН СССР. Л., 1978, стр. 17.
3. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975, стр. 18.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972, стр. 166, 243.
5. Грекулова А. Н. В сб. трудов: Актуальные проблемы кардиологии, т. 12. Тбилиси, 1979, стр. 128.
6. Дятловицкая Э. В., Торховская Т. И., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 1969, 34, стр. 177.

7. Каган В. Е., Ритов В. Б., Котелевцева С. В. и др. В кн.: Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки. М., 1974, стр. 89.
8. Каргаполов А. В., Ягужинский Л. С. Биохимия, 1978, 43, 12, стр. 2150.
9. Козлов Ю. П. В кн.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., 1977, стр. 80.
10. Ланкин В. Э., Тихазе А. К., Катаевцева И. В. Кардиология, 1976, 2, стр. 23.
11. Меерсон Ф. З. Кардиология, 1979, 6, стр. 9.
12. Мельничук Н. И. Дисс. канд. Ужгород, 1971.
13. Мирончик И. Ф. Здоровоохранение Белоруссии, 1965, 6, стр. 21.
14. Тужилин С. А., Салузня А. И. Лабор. дело, 1975, 6, стр. 334.
15. Шеленкова Л. Н., Биленко М. Н. Тезисы III Всесоюзн. симпоз. АН СССР, АМН СССР, Л., 1978, стр. 148.
16. Юденфренд С. Флюоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.
17. Яхнина Д. Н., Устинова М. И., Агабекова И. И. и др. В сб.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М., 1977, стр. 53.
18. Badano V. N., Boveris A., Stoppant A. O. M., Vigal Y. C. Mol. and Cell. Biochem., 1973, 2, 157.
19. Balley H. Vitamin E. Your key to a healthy heart. New York, 1967.
20. Bartlett Y. R. J. Biol. Chem., 1959, 237, 466.
21. Folch J., Lees M., Stanley G. H. J. Biol. Chem., 1957, 226, 497.
22. Shamberger R. I., Biochem J., Vignals P., Andre J. Federat. Eur. Biochem. Soc. meet. 5 th, 1968, 43. Mitochondria: Struc. Funct.
23. Watte M. Biochem., 1969, 8, 2536.