

УДК 577.11:612.82+612.742.1]:546.41

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ Ca^{2+} В ДИНАМИКЕ ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА *IN VITRO*

Г.А.Грибанов¹, М.Ю.Головко², Ю.Н.Боринский², Л.Я.Дьячкова²

¹Тверской государственной университет, 170002, г.Тверь, д.70А, корпус 5;
тел.36-06-33

²Тверская государственная медицинская академия,
170000, г.Тверь, ул. Советская, д.4, каф.

Исследовано влияние экзогенных ионов Ca^{2+} на аутолитические изменения липидов серого вещества головного мозга крыс при инкубации в среде стерильного физиологического раствора *in vitro*. При аутолизе серого вещества в среде стерильного физиологического раствора отмечали колебательный характер изменений количества общих липидов. Доля фосфолипидов уменьшалась с параллельным накоплением ДГ и СЖК. Содержание холестерина и его эфиров менялось в реципрокном колебательном режиме с преобладанием реакций распада эфиров холестерина, начиная с 4 ч аутолиза и далее. Наиболее вероятными были гидролитические пути деградации фосфолипидов, а также эфиров холестерина, особенно на поздних сроках аутолиза. Не исключаются и трансацилазные взаимоотношения между фосфолипидами, холестерином и его эфирами. Наличие ионов Ca^{2+} в среде инкубации способствовало снижению содержания общих липидов в аутолизирующемся сером веществе, начиная с 10 мин аутолиза и далее в течение суток. Уменьшение концентрации липидов происходило в основном за счет снижения уровня фосфолипидов и в меньшей степени холестерина. При этом экзогенные ионы Ca^{2+} усиливали не только гидролитический распад фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот, диацилглицеринов, но и трансацилазные пути превращений фосфолипидов, ведущие к накоплению триацилглицеринов и эфиров холестерина. Наиболее существенно гидролитические и трансацилазные процессы проявлялись на ранних (10 мин) и более поздних (24 ч) сроках аутолиза.

Ключевые слова: аутолиз, обмен липидов, серое вещество головного мозга животных, ионы кальция

ВВЕДЕНИЕ. Аутолитические процессы занимают центральное место при развитии деструктивных изменений в переживающих структурах нервной системы, подверженных ишемии, гипоксии и при других энергодефицитных состояниях [1, 2]. В связи с этим исследование механизмов развития аутолиза имеет не только важное теоретическое, но и практическое значение при разработке приемов реанимационных, репаративных мероприятий, консервации и трансплантации органов и тканей, судебно-медицинских, геронтологических и других прикладных направлений биологии и медицины [3, 4].

Известно, что эволюционно более молодые системы разрушаются быстрее, чем филогенетически более старые, что подтверждено многими исследованиями [1, 5]. Данная закономерность выявляется и на примере развития клинической смерти, смерти мозга, когда в первую очередь повреждается серое вещество

ДИНАМИКА ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА *IN VITRO*

больших полушарий головного мозга [3]. При этом существенным перестройкам подвергается липидный компонент ЦНС [6-8]. Одним из факторов, активирующих аутолитические процессы в переживающих структурах, может являться изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [9, 10].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния экзогенных ионов кальция на аутолитические превращения липидного компонента серого вещества головного мозга крыс *in vitro*.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили по описанной ранее схеме [7, 11]. В работе использовали беспородных белых крыс - самцов массой 120-140 г, содержащихся на стандартном рационе. Все операции после декапитации животных (извлечение мозга и его отмывание от крови, приготовление навесок серого вещества головного мозга крыс) проводили на холоду при температуре таящего льда и по возможности быстро (как правило, в течение 1-2 мин). Затем образцы ткани (20-30 мг) помещали в 1 мл либо стерильного физиологического раствора (контроль, далее ФР), либо в среду ФР, содержащую $2 \cdot 10^{-3}$ М Ca^{2+} (опыт, далее ФР + Ca^{2+}) и инкубировали при 37°C. Экстракцию липидов проводили по методу Bligh и Dyer [12] сразу после помещения образцов серого вещества в среду инкубации (условно 0 мин аутолиза), а также через 10 мин, 1 ч, 4 ч и 24 ч инкубации [5, 7]. Для отмывания липидного экстракта от нелипидных примесей использовали 0,02% раствор $CaCl_2$.

Определение содержания общих липидов, их фракционирование методом одномерной микрогелевой хроматографии на силикагеле и последующий количественный анализ состава отдельных фракций липидов проводили по методикам, описанным ранее [13]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Данные об изменениях содержания общих липидов (ОЛ) и их отдельных фракций при инкубации серого вещества в среде ФР представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, при аутолизе серого вещества в среде стерильного ФР отмечался колебательный характер изменений количества ОЛ: в первые 10 мин их количество незначительно возрастало, через 1 ч снижалось, а на поздних сроках (24 ч) проявлялась тенденция к возврату содержания ОЛ к исходному уровню.

При анализе содержания отдельных представителей липидов (табл. 1) выявлено, что в исходном состоянии около 70 % (2986 мг%) от всех ОЛ серого вещества составляют фосфолипиды (ФЛ). Количество суммарного холестерина составило около 23% (981 мг-%), из которых около 18% (789 мг%) представлено свободным холестерином (Х). Относительное содержание остальных фракций (неэстерифицированные, или свободные жирные кислоты (СЖК), триацилглицерины (ТГ) и диацилглицерины (ДГ)) не превышало 2-3%.

В динамике аутолиза относительная доля ФЛ уменьшалась, начиная с 10 мин инкубации, с параллельным накоплением ДГ, ТГ, эфиров холестерина (ЭХ) и, особенно, СЖК. Как было показано ранее [7], полученные данные объясняются, вероятно, активацией эндогенных фосфолипаз типа A_1 , A_2 , и С. Подобная динамика изменений ФЛ, СЖК и ДГ при умирании головного мозга животных отмечалась и другими исследователями [6, 8].

Содержание Х и ЭХ менялось в колебательном режиме: на 1 и 4 ч аутолиза относительное количество Х уменьшалось, а ЭХ - увеличивалось в течение первых 10 мин и 1 ч. К 24 ч количество Х и ЭХ возвращалось к исходным значениям (как в относительном, так и в абсолютном выражении). Возможно, отмеченная динамика изменений этих фракций связана с достаточно активно протекающими на ранних сроках инкубации (10 мин, 1 ч) реакциями эстерификации Х как за счет СЖК, так и ацильных остатков ФЛ. Вероятность реализации подобных трансацилазных механизмов при аутолизе нервной ткани была показана ранее рядом исследователей [5, 15]. На более поздних сроках (4 и 24 ч аутолиза), очевидно, преобладают реакции гидролиза ЭХ.

Таблица 1. Изменения количества общих липидов и их состава в сером веществе головного мозга крыс при аутолизе в среде стерильного физиологического раствора (в % от суммы фракций, n=11)

Показатели	Сроки аутолиза:				
	Оч	10мин	1ч	4ч	24ч
ОЛ(мг%**)	4265,0±102,7	4616,2±73,4*	3607,0±66,6*	3841,2±49,1*	4191,4±73,0
% изменений		108,0	84,6	90,6	
ФЛ	70,0±0,8	58,7±0,8*	58,1±1,2*	58,7±0,4*	52,4±1,1*
% изменений		83,9	83,0	83,9	74,9
мг%**	2985,5±34,1	2709,7±36,9*	2095,7±43,3*	2254,8±15,4*	2196,3±46,1*
ДГ	1,8±0,2	2,9±0,1*	2,7±0,1*	3,9±0,1*	3,8±0,1*
% изменений		161,1	150,0	216,7	211,1
мг%**	76,8±8,5	133,9±4,6*	97,4±3,6*	149,8±3,8*	159,3±4,2*
Х	18,5±0,4	17,5±0,5	14,0±0,4*	16,6±0,4*	17,4±0,6
% изменений			75,7	89,7	
мг%**	789,0±17,1	807,8±23,1	505,0±14,4*	637,6*±15,4	729,3±25,1
СЖК	3,3±0,2	11,1±0,4*	14,7±0,6*	13,7±0,1*	18,9±1,0*
% изменений		336,4	445,5	415,2	572,7
мг%**	140,7±8,5	512,4±18,5*	530,2±21,6*	526,2±3,8*	792,7±41,9*
ТГ	2,2±0,2	3,0±0,1*	2,5±0,2	1,9±0,1	2,8±0,1*
% изменений		136,4			127,3
мг%**	93,8±8,5	138,5±4,6*	90,2±7,2	73,0±3,8	117,4±4,2*
ЭХ	4,2±0,3	6,8±0,3*	8,0±0,2*	5,2±0,2	4,7±0,6
% изменений		161,9	190,5		
мг%**	179,1±12,8	313,9±13,8*	288,6*±7,2	199,7±7,7	197,0±25,1

Примечание: Здесь и в табл. 2. *- достоверно различающиеся значения при $p < 0,05$ (для них приведен % изменений); ** - абсолютное содержание липидов (на влажный вес ткани). Представлены средние значения 11 опытов (\pm ошибка средней)

Изменения ТГ имели слабо выраженный колебательный характер.

Анализ изменений содержания отдельных представителей ОЛ, выраженных в абсолютных величинах (в мг% от сырой массы ткани, табл. 1), позволяет уточнить некоторые предполагаемые механизмы колебательных изменений ОЛ в сером веществе. Так, например, при анализе полученных данных можно предположить, что увеличение количества ОЛ на 10 мин инкубации происходит, в основном, за счет СЖК, а также ЭХ, ДГ и (меньше) ТГ, но не ФЛ. Возможно, это связано с тем, что в ранние периоды умирания (близкие к клинической смерти) в ткани мозга сохраняется синтетический потенциал в отношении СЖК, ТГ, ЭХ, а также интенсифицируются гликолитические процессы на фоне снижения активности ферментов ЦТК [16, 17], что может способствовать увеличению содержания ОЛ. На более поздних сроках аутолиза серого вещества (24 ч) поддержание высокого (близкого к исходному) уровня ОЛ, вероятно, связано со снижением активности некоторых липолитических ферментов. Вместе с тем, следует отметить, что возрастание содержания ОЛ в тканях мозга может быть и результатом увеличения экстрагируемости липидов, которая зависит как от величины рН (многими исследователями отмечено уменьшение рН при гипоксических и ишемических состояниях нервной ткани [18]) и наличия ионов двухвалентных металлов в среде, так и от физико-химического состояния липидов нейрональных мембран на некоторых сроках аутолиза, чему способствует, в частности, снижение относительного содержания Х в мозговых структурах, вызывая, тем самым, увеличение подвижности мембранных липидов [19].

ДИНАМИКА ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА *IN VITRO*

При этом важное значение приобретают трансацилазные перестройки в реципрокных парах и триадах (X-ЭХ, ФЛ-X-ЭХ, ФЛ-ДГ-ТГ и др., идущие как через обмен ацильных остатков, так и через пул СЖК [20]), которые изменяют соотношения X/ЭХ, X/ФЛ, содержание СЖК мембран, тем самым влияя на их физико-химические свойства.

На более поздних сроках аутолиза в среде ФР снижение концентрации ОЛ в сером веществе связано, по всей вероятности, преимущественно с уменьшением абсолютного содержания ФЛ, в меньшей степени X, но не других представителей липидов.

В табл. 2 представлены данные об изменениях содержания липидов и их отдельных представителей при аутолизе серого вещества в среде ФР + Ca²⁺. Как видно, наличие ионов Ca²⁺ в среде инкубации существенно видоизменяют характер изменений содержания ОЛ. Начиная с 10 мин инкубации, их количество достоверно снижалось (в колебательном режиме) по сравнению с динамикой изменений в среде ФР. Основной причиной снижения уровня ОЛ в сером веществе в присутствии ионов Ca²⁺, возможно, является активация эндогенных липаз, прежде всего фосфолипаз. Это подтверждается и при анализе изменений абсолютных значений концентраций липидных фракций (табл. 2): уменьшение доли ОЛ связано, прежде всего, с распадом ФЛ (с 2986 мг% до 1111 мг% в течение суток), тогда как снижение абсолютных концентраций других представителей липидов в сером веществе было менее выраженным.

Таблица 2. Влияние ионов кальция (2·10⁻³ М) на изменения количества общих липидов и их состава в сером веществе головного мозга белых крыс при аутолизе (в % от суммы фракций, n=5)

Показатели	Сроки аутолиза:				
	0ч	10мин	1ч	4ч	24ч
ОЛ-(мг%**)	4265,0±102,7	3426,7±83,9*	2803,7±153,6*	4106,4±120,6	3200,2±97,6*
% изменений		80,4	65,7		75,0
ФЛ	70,0±0,8	42,3±0,4*	43,7±0,4*	40,7±0,7*	34,7±1,8*
% изменений		60,4	62,4	58,1	49,6
мг%**	2985,5±34,1	1449,5±13,7*	1225,2±11,2*	1671,3±28,7*	1110,5±57,6*
ДГ	1,8±0,2	4,9±0,2*	5,3±0,2*	5,3±0,2*	5,6±0,2*
% изменений		272,2	294,4	294,4	311,1
мг%**	76,8±8,5	167,9±6,9*	148,6±5,6*	217,6±8,2*	179,2±6,4*
X	18,5±0,4	13,0±0,3*	13,0±0,5*	11,8±0,2*	14,2±0,5*
% изменений		70,3	70,3	63,8	76,8
мг%**	789,0-17,1	445,5-10,3*	364,5-14,0*	484,6-8,2*	454,4-16,0*
СЖК	3,3±0,2	16,0±0,3*	16,6±0,9*	16,6±0,3*	24,4±1,1*
% изменений		484,8	503,0	503,0	739,4
мг%**	140,7±8,5	548,3±10,3*	465,4±25,2*	681,7±12,3*	780,8±35,2*
ТГ	2,2±0,2	8,7±0,2*	8,1±0,8*	9,8±0,4*	12,6±1,7*
% изменений		395,5	368,2	445,5	572,7
мг%**	93,8±8,5	298,1±6,9*	227,1±22,4*	402,4±16,4*	403,2±54,4*
ЭХ	4,2±0,3	15,1±0,4*	13,3±0,6*	15,8±0,2*	8,5±0,5*
% изменений		369,5	316,7	376,2	202,4
мг%**	179,1±12,8	517,4±13,7*	372,9±16,8*	648,8±8,2*	272,0±16,0*

Примечания: Обозначения см. табл.1.

К 10 мин инкубации серого вещества в среде, содержащей экзогенные ионы Ca²⁺, относительное количество ФЛ и X серого вещества снижалось более значительно (по сравнению с условиями ФР) с параллельным существенным увеличением содержания СЖК, ДГ, ТГ и ЭХ соответственно в 4,8 раза, 2,7 раза, 4,0 раза и 3,7 раза (по сравнению с исходными величинами).

К 1 и 4 ч инкубации дальнейших значительных изменений соотношения липидных фракций не наблюдалось.

Через 24 ч количество ФЛ уменьшалось и составило лишь половину от исходных значений, что было также существенно ниже относительной концентрации ФЛ при проведении аутолиза в среде ФР. Доля СЖК значительно увеличивалась (в 7,4 раза по сравнению с исходными величинами и примерно в 1,5 раза по сравнению с инкубацией в ФР). Уровень ЭХ снижался, не достигая, однако, первоначальных величин, с параллельным накоплением ТГ и Х, причем концентрация Х была ниже, чем в исходном состоянии. Содержание ДГ оставалось на высоком уровне (5,6% от суммы фракций). Необходимо отметить, что, в отличие от условий ФР, содержание ТГ и ЭХ существенно превышало и первоначальные концентрации, начиная с 10 мин аутолиза и далее.

Как следует из полученных данных, в условиях введения в среду инкубации ионов Ca^{2+} скорость распада ФЛ серого вещества в динамике аутолиза значительно увеличивалась, что сопровождалось значительным накоплением СЖК и ДГ уже в первые 10 мин аутолиза. Эти изменения согласуются с литературными данными о нарастании содержания СЖК при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [10], что может быть связано с усилением активности Ca^{2+} - зависимых фосфолипаз. Обращает на себя внимание и значительное увеличение доли ТГ и ЭХ. В связи с этим, другим возможным механизмом уменьшения доли ФЛ в присутствии экзогенных ионов Ca^{2+} , вероятно, является более выраженный перенос ацильных остатков не только с ФЛ на Х с образованием ЭХ (что проявлялось, хотя и менее значительно, и в условиях ФР), но и в системе ФЛ-ДГ с синтезом ТГ, о чем свидетельствует и существенное нарастание ТГ в аутолизующемся сером веществе мозга в присутствии ионов Ca^{2+} . Возможно, что образование ЭХ за счет ФЛ протекает через пул СЖК [20].

Таким образом, экзогенные ионы Ca^{2+} существенно изменяют характер аутолитических изменений липидов серого вещества головного мозга крыс. Основным в механизме модулирующего эффекта ионов кальция является активирование эндогенных фосфолипаз уже в первые 10 мин аутолиза. Такие гидролитические и другие пути биотрансформации ФЛ были наиболее выраженными к 24 ч аутолиза. Важное значение в регулируемых ионами кальция механизмах изменений липидов принадлежит описанным ранее трансацилазным перестройкам липидов в системах ФЛ-ДГ, ФЛ-Х с образованием ТГ и ЭХ, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лушников Е.Ф., Шапиро Н.А. (1974) Аутолиз. - М.
2. Ikuta F., Takeda S. (1993) Clin. Neuropathol. 12, 251.
3. Неговский В.А., Гурвич А.М. и др. (1987) Постреанимационная болезнь. М.: Медицина.
4. Полежаев Л.В., Александрова М.А. (1986) Трансплантация тканей мозга в норме и патологии. - М.: Медицина.
5. Грибанов Г.А., Бурлакова Е.Б., Архипова Г.В., Ильяшенко Д.В. (1994) Вопр. мед. химии, 40, 49-51.
6. Vazan N.C., Rodriguez de Turco E.B. (1980) Adv. Neurol., 28, 197-205.
7. Грибанов Г.А., Головкин М.Ю. (1998) Вопр. мед. химии, 44, 241-247.
8. Грибанов Г.А., Ильяшенко Д.В. (1993) Вопр. мед. химии, 39, 43-45.
9. Сороковой В.И., Владимиров Ю.А. (1975) Биофизика. Итоги науки и техн.-ВИНИТИ АН СССР, 5, 11-55.
10. Bonventre J.V. (1997) J. Lipid Mediat. Cell Signall., 16, 199-208.

ДИНАМИКА ПОСМЕРТНОГО АУТОЛИЗА *IN VITRO*

11. Грибанов Г.А., Ашмарин И.П., Ильяшенко Д.В., Головки М.Ю., Луцкая Н.В. (1993) Тез. докл. научн. конф. профессорско-преподав. состава и сотрудников госбюдж. ихоздогов. тем. Тверь, с.128-129.
12. Bligh E., Dyer W.A. (1959) *Can. J. Biochem.* **37**, 911-917.
13. Грибанов Г.А., Сергеев С.А. (1975) Лаб. дело, 652-654.
14. Терентьев П.В., Ростова Н.С. (1977) Практикум по биометрии. Л.: ЛГУ.
15. Masuzawa Y., Sugiura T., Sprecher H., et al. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **1005**, 1-12.
16. Гаевская М.С. (1963) Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. - М.: Медгиз., с.207.
17. Лобов В.В., Конвай В.Д. (1963) *Вопр. мед. химии.* **37**, 45-48.
18. Akino M., Odonnell M., Robitaille P.M.L., et al. (1997) *Investigative Radiology.* **32**, 382-388.
19. Кеймс М. (1975) Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир.
20. Грибанов Г.А. (1979) *Успехи совр. биол.*, **87**. 16-32.

Поступила 26.04.00

CHANGES IN THE LIPID COMPONENTS OF BRAIN GREY MATTER TISSUE OF RATS AT THE INFLUENCE OF Ca²⁺ IONS DURING POSTMORTAL AUTHOLYSIS IN VITRO

G.A.Gribanov¹, M.U.Golovko², Y.N.Borinsky², L.Ja.Djatchkova²

¹Tver State University

²Tver State Medical Academy

The influence of exogenous ions Ca²⁺ on the autholytic alterations of lipids in the brain grey matter of rats was investigated during incubation in a sterile physiological solution *in vitro*. The level of phospholipids decreased with parallel accumulation of diacylglycerols and free fatty acids. The contents of cholesterol and its esters varied in reciprocal oscillatory mode with prevalence of the disintegration of cholesterol esters started after 4 hrs of autholysis and further. The most probable degradation reactions of phospholipids and also cholesterol esters were the hydrolytic reactions. Transacylation reactions of between phospholipids, cholesterol and its esters were also possible. The presence of exogenous Ca²⁺ ions in the incubation medium promoted decrease of the total lipid grey matter. This effect was noted 10 min after onset of autolysis and continued up to 24 h. The reduction of lipid concentration occurred due to the decrease of phospholipid level and to a lesser extent - to the cholesterol level.

Key words: autholysis, lipid metabolism, grey matter of animal brain, Ca²⁺ ions