

ВЛИЯНИЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ХАРАКТЕР АУТОЛИТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА ТКАНИ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС *IN VITRO*.

Г.А.ГРИБАНОВ, М.Ю.ГОЛОВКО

Тверской государственный университет.

Исследован характер аутолитических перестроек липидов серого и белого вещества головного мозга крыс *in vitro* в среде стерильного физиологического раствора в присутствии цитопротекторных концентраций бычьего сывороточного альбумина. Экзогенный бычий сывороточный альбумин в аутолизирующемся сером веществе предотвращал распад фосфолипидов и накопление свободных жирных кислот до 1 ч инкубации и способствовал увеличению доли эфиров холестерина к 4 и 24 ч аутолиза. В поздние сроки (24 ч) БСА усиливал распад ФЛ. В белом веществе бычий сывороточный альбумин, напротив, активировал распад фосфолипидов уже на ранних сроках инкубации (10 мин). Вместе с тем он существенно видоизменял характер реципрокных колебательных взаимоотношений холестерина и его эфиров на противоположный, способствуя значительному накоплению эфиров холестерина, особенно на 10 мин и к 4 ч аутолиза.

Ключевые слова: аутолиз, обмен липидов, серое и белое вещество головного мозга животных, альбумины.

ВВЕДЕНИЕ. Начальные и последующие этапы гибели и аутолиза различных клеток и тканей, нервной в частности, сопровождаются накоплением незастерилизованных жирных кислот, лизофосфолипидов, фосфатидных кислот, [1,2], а также изменениями других биохимических показателей [3]. Известно также, что свободные жирные кислоты (СЖК), наряду с другими продуктами распада липидов, оказывают повреждающее действие на биологические структуры различного уровня организации [4,5]. Одним из факторов, связывающих эти вещества, является альбумин [6]. Цитопротекторные свойства бычьего сывороточного альбумина показаны для гибнущих гепатоцитов, эритроцитов и др. клеток, а также некоторых клеточных структур [7].

С учетом вышеизложенного, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния экзогенного бычьего сывороточного альбумина на аутолитическую деструкцию липидного компонента серого и белого вещества головного мозга крыс в динамике аутолитического процесса.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 120-140 г, содержащихся на стандартном рационе в летний период. Крыс декапировали и быстро (в течение 20-35 с), на холоду, извлекали мозг. В опытах использовали образцы серого вещества коры больших полушарий и соответствующие им участки белого вещества. Навески ткани (20-30 мг) мелко иссекали и инкубировали в 1 мл либо стерильного физиологического раствора (контроль, далее ФР) [8], либо в среде ФР, содержащей 1% бычьего сывороточного альбумина (опыт, далее ФР+БСА) при температуре

37°C. Данное количество БСА соответствовало его цитопротекторным концентрациям, находящимся в интервале от 0,1% до 6,5% [4]. Липиды экстрагировали сразу (условно 0 мин аутолиза, исходное состояние), а также через 10 мин, 1 ч, 4 ч и 24 ч инкубации [2]. Экстракцию липидов проводили по методу Блайя и Дайера [9]. Для отмывания липидного экстракта от нелипидных примесей использовали 0,02% раствор CaCl_2 .

Аутолитические перестройки липидного компонента ткани мозга оценивали по изменению количества липидов и их отдельных фракций. Количественное определение липидов, их фракционирование с использованием микротонкослойной хроматографии на силикагеле и последующий анализ отдельных липидных фракций проводили по методикам, описанным ранее [10]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как видно из табл. 1, в условиях инкубации серого вещества в ФР изменения содержания ОЛ носили колебательный характер: в первые 10 мин аутолиза их количество незначительно возрастало, через 1 час снижалось на 16%. На поздних сроках проявлялась тенденция к возврату содержания ОЛ к исходному уровню. Количество ОЛ белого вещества (табл. 2) в динамике аутолиза, напротив, прогрессивно снижалось до 54 % от первоначальных значений.

Таблица 1. Изменения липидов серого вещества головного мозга крыс при аутолизе в среде стерильного физиологического раствора (в процентах от суммы фракций, $n=11$)

Сроки аутолиза:	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
Показатели					
ОЛ (мг%) (% контроля)*	4265,0±102,7	4616,2±73,4 (108,0)	3607,0±66,6 (84,6)	3841,2±49,1 (90,6)	4191,4±73,0
ФЛ (% контроля)	70,0±0,8	58,7±0,8 (83,9)	58,1±1,2 (83,0)	58,7±0,4 (83,9)	52,4±1,1 (74,9)
ДГ (% контроля)	1,8±0,2	2,9±0,1 (161,1)	2,7±0,1 (150,0)	3,9±0,1 (216,7)	3,8±0,1 (211,1)
Х (% контроля)	18,5±0,4	17,5±0,5	14,0±0,4 (75,7)	16,6±0,4 (89,7)	17,4±0,6
СЖК (% контроля)	3,3±0,2	11,1±0,4 (336,4)	14,7±0,6 (445,5)	13,7±0,1 (415,2)	18,9±1,0 (572,7)
ТГ (% контроля)	2,2±0,2	3,0±0,1 (136,4)	2,5±0,2	1,9±0,1	2,8±0,1 (127,3)
ЭХ (% контроля)	4,2±0,3	6,8±0,3 (161,9)	8,0±0,2 (190,5)	5,2±0,2	4,7±0,6

*Здесь и далее в скобках приводится % от исходных значений (0 ч аутолиза) для достоверно различающихся величин при $p<0.05$. Фракции липидов выражены в виде % ОЛ.

На ранних сроках аутолиза серого вещества БСА не оказывал существенного влияния на динамику изменений ОЛ по сравнению с условиями ФР (табл. 3), однако к 4 часу инкубации возврат общих липидов исходному уровню был более выражен, чем в среде ФР. Через 24 часа аутолиза было отмечено падение ОЛ до 79% от первоначального количества. Содержание ОЛ в белом веществе под влиянием БСА (табл.4) также, как и при аутолизе в среде ФР, имело тенденцию к снижению, однако, в значительно меньшей степени.

Данные об изменениях состава липидов серого и белого вещества головного мозга

крыс при аутолизе в среде ФР представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, в исходном состоянии около 70% от всех ОЛ серого вещества составляют фосфолипиды (ФЛ). Количество суммарного холестерина составляло около 23%, из которых около 18% представлено свободным холестерином (Х). Относительное содержание остальных фракций (неэстерифицированные, или свободные жирные кислоты (СЖК), триацилглицерины (ТГ), и диацилглицерины (ДГ)) не превышало 2-3%.

Таблица 2. Изменения липидов белого вещества головного мозга белых крыс при аутолизе в среде стерильного физиологического раствора (в Х от суммы фракций, n=11)

Сроки аутолиза:	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
Показатели					
ОЛ (мг%) (% контроля)	7573,0±151,0	6202,1±125, (81,9)	5267,5±123 (69,5)	4737,3±116 (62,6)	4120,6±161, (54,4)
ФЛ (% контроля)	66,1±0,6	68,1±0,9	60,3±1,5 (91,2)	64,2±0,3	55,2±0,7 (83,5)
ДГ (% контроля)	2,9±0,2	2,4±0,1	3,0±0,1	2,1±0,07 (72,4)	3,8±0,2 (131,0)
Х (% контроля)	15,9±0,4	19,4±0,4 (122,0)	16,6±0,5	17,7±0,5 (111,3)	15,6±0,5
СЖК (% контроля)	4,9±0,3	4,0±0,1 (81,6)	8,3±0,2 (169,4)	8,3±0,1 (169,4)	12,9±0,7 (263,3)
ТГ (% контроля)	3,6±0,1	2,7±0,2 (75,0)	3,4±0,4	2,1±0,1 (58,3)	2,5±0,3 (69,4)
ЭХ (% контроля)	6,6±0,3	3,4±0,2 (51,5)	8,4±0,4 (127,3)	5,6±0,4	10,0±0,7 (151,5)

В первые 10 мин аутолиза отмечено снижение доли ФЛ на 16% от исходных величин с параллельным увеличением СЖК в 3,4 раза и менее значительным накоплением эфиров холестерина (ЭХ), ДГ и ТГ (на 62%, 61%, и 36% от начальных значений, соответственно).

В течение 1 ч инкубации серого вещества головного мозга в среде ФР содержание ФЛ, ДГ, ТГ значительно не изменялось, доля СЖК, ЭХ увеличивалась с одновременным падением количества Х.

К 4 ч аутолиза содержание ФЛ и СЖК по-прежнему не изменялось, количество ТГ и ЭХ снижалось с одновременным накоплением ДГ (в 2,2 раза) и незначительным увеличением Х. Следует отметить, что содержание фракций ТГ, ЭХ и Х не достигало исходных значений.

Через 24 ч инкубации доля ФЛ вновь начинала уменьшаться (на 25% от исходных величин) с дальнейшим увеличением количества СЖК (в 5,7 раза по сравнению с начальными значениями). Содержание Х возрастало при параллельном снижении уровня ЭХ до начальных величин.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о ступенчатой активации эндогенных фосфолипаз в аутолизующемся сером веществе головного мозга крыс с наибольшей выраженностью в течение первых 10 мин и к концу первых суток инкубации с одновременным накоплением в указанные сроки значительных количеств СЖК. Сходные механизмы аутолитической деградации липидов серого вещества были отмечены и для другой модели аутолиза мозга [2,13].

В белом веществе головного мозга крыс в условиях инкубации *in vitro* в ФР (табл.2) также отмечен высокий начальный уровень содержания ФЛ и Х (около 66% и 16% соответственно от суммы фракций), но выявлены несколько большие исходные величины содержания ЭХ, СЖК, ТГ и ДГ по сравнению с липидами серого вещества. Вме-

сте с тем, динамика аутолитических перестроек различных ацилсодержащих фракций (ФЛ, ТГ, ЭХ) белого вещества имела отличный от серого вещества характер.

В первые 10 мин инкубации количество ФЛ менялось незначительно. Более выраженными оказались холестеролэстеразные реакции, когда параллельно снижению содержания ЭХ (в 2 раза) количество Х возрастало (в 1,2 раза), однако без накопления СЖК и значительных изменений ДГ и ТГ.

К 1 ч аутолиза отмечено небольшое, но достоверное уменьшение относительного содержания ФЛ (на 10% от исходных величин), с одновременным увеличением СЖК, а также ЭХ на фоне возврата Х к исходным значениям. Существенных изменений фракций ДГ и ТГ не выявлено.

На 4 ч инкубации содержание ФЛ вновь достигало исходных значений с параллельным снижением ЭХ и некоторым накоплением Х, но без дальнейшего увеличения доли СЖК. Содержание ДГ и ТГ снижалось незначительно.

К 24 ч содержание ФЛ вновь уменьшалось (на 17% от начальных величин), что сопровождалось значительным увеличением доли СЖК и ЭХ (в 2,6 и 1,5 раза соответственно) и несколько меньшим накоплением ДГ. Количество Х мало отличалось от исходных значений, а ТГ оставалось сниженным.

Таким образом, в белом веществе характерным является колебательный характер изменений ФЛ, Х и ЭХ, связанный, возможно, с изменением фосфолипазных и холестеролэстеразных активностей, а также перемещениями остатков жирных кислот (с участием трансацилазных механизмов) в системе ФЛ-Х-ЭХ. Возможность реализации последних механизмов была показана ранее для различных аутолизующихся тканей [12], а также для мозговых структур [2,13,14].

В условиях проведения аутолиза серого вещества головного мозга крыс с добавлением цитопротекторных концентраций БСА выявлена иная динамика изменений липидного компонента (табл. 3). Количество ДГ и СЖК в первые 10 мин инкубации падало

Таблица 3. Влияние бычьего сывороточного альбумина на аутолитические изменения липидного компонента серого вещества головного мозга белых крыс (в % от суммы фракций, n=5)

Сроки аутолиза:	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
Показатели					
ОЛ (мг%) (% контроля)	4265,0±102,7	4853,6±60,5 (113,8)	3427,1±195,1 (80,4)	4134,7±95,5	3370,1±166,6 (79,0)
ФЛ (% контроля)	70,0±0,8	78,5±1,1	62,5±1,0 (89,3)	62,4±0,7 (89,1)	43,3±1,3 (61,9)
ДГ (% контроля)	1,8±0,2	1,0±0,06 (55,6)	2,4±0,1	2,2±0,1	4,7±0,5 (261,1)
Х (% контроля)	18,5±0,4 1	18,0±0,7	16,8±1,9	16,1±0,3 (87,0)	14,8±0,5 (80,0)
СЖК (% контроля)	3,3±0,2	1,6±0,2 (48,5)	10,1±0,1 (306,1)	7,7±0,8 (233,3)	19,3±1,4 (584,8)
ТГ (% контроля)	2,2±0,8	2,7±0,5	2,4±0,06	2,5±0,7	4,1±0,5 (186,4)
ЭХ (% контроля)	4,2±0,3	4,2±1,7	5,8±0,1 (138,1)	9,1±0,4 (216,7)	13,8±1,1 (328,6)

без параллельного нарастания ТГ и ЭХ, что может свидетельствовать о связывании части СЖК экзогенным альбумином и их использовании в дальнейших метаболических процессах. Достоверное падение уровня ФЛ отмечено лишь к 1 ч инкубации (на 10 %). Тогда

же выявлялось и значительное накопление доли СЖК (в 3 раза). На ранних сроках (10 мин и 1 ч) содержание Х и ЭХ менялось незначительно. Через 4 ч инкубации количество ФЛ оставалось сниженным. На фоне некоторого уменьшения доли СЖК отмечено нарастание содержания ЭХ с параллельным незначительным снижением Х. Для ДГ и ТГ существенных изменений не выявлялось.

К 24 ч отмечено резкое падение количества ФЛ и менее значительное Х (на 38% и 20% от исходных величин соответственно) с одновременным значительным нарастанием уровней СЖК и ЭХ (в 5,8 и 3,3 раза соответственно, по сравнению с начальными значениями). Выше исходных были и относительные количества ТГ и ДГ.

Эти результаты можно трактовать как проявление выраженного протектирующего (предотвращающего распад липидов) действия БСА лишь на ранних сроках аутолиза серого вещества (10 мин), прежде всего в отношении ФЛ, ЭХ и ТГ. БСА не защищает от распада ФЛ, особенно в поздние сроки (24 ч). Это, возможно, связано с гидролизом экзогенного альбумина при участии протеолитических систем аутолизующегося серого вещества головного мозга крыс. Нарастание в этих условиях количества ацилсодержащих фракций, в особенности ЭХ, а также ТГ и ДГ в поздние сроки аутолиза может быть обусловлено как усилением трансацилазных механизмов (между ФЛ, Х, ЭХ, ТГ и ДГ), так и угнетением соответствующих липолитических систем в отношении фракций ФЛ (на ранних сроках аутолиза (10 мин)) и ЭХ (на более поздних сроках (4 и 24 ч)). В литературе имеются указания об ингибирующем действии БСА на фосфо- и триглицеридлипазы [4,15]. Возможно, что сходным эффектом могут обладать и некоторые продукты гидролиза БСА.

В отличие от серого вещества уже в первые минуты инкубации белого вещества БСА активирует распад ФЛ и ДГ, вызывает снижение доли Х с одновременным резким нарастанием уровня ЭХ (в 2,7 раза) и ТГ, но без параллельного нарастания количества СЖК (табл.4).

Таблица 4. Влияние бычьего сывороточного альбумида на аутолитические изменения липидного компонента белого вещества головного мозга белых крыс (в % от суммы фракций, n=5)

Сроки аутолиза:	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
Показатели					
ОЛ (мг%)	7573,0±151,1	7306,6±129,5	6244,6±146,4	6202,1±197,9	6244,6±309,8
% изменений			(82,5)	(81,9)	(82,5)
ФЛ	66,1±0,6	57,3±0,3	61,0±0,6	55,3±0,7	52,9±0,7
% изменений		(86,7)	(92,3)	(83,7)	(80,0)
ДГ	2,9±0,2	1,1±0,1	1,4±0,04	1,2±0,4	0,9±0,1
% изменений		(37,9)	(48,3)	(41,4)	(31,0)
Х	15,9±0,4	14,1±0,5	15,8±0,5	13,6±0,6	15,0±0,2
% изменений		(88,7)		(85,5)	
СЖК	4,9±0,3	4,4±0,9	7,9±0,6	7,0±0,7	13,9±0,4
% изменений			(161,2)	(142,9)	(283,7)
ТГ :	3,6±0,1	5,1±0,2	3,4±0,6	5,3±0,7	5,0±0,1
% изменений		(141,7)		(141,2)	(138,9)
ЭХ	6,6±0,3	18,0±0,1	10,5±0,7	17,6±0,5	12,3±1,1
% изменений		(272,7)	(159,1)	(267,7)	(186,4)

К 1 ч аутолиза содержание ФЛ и Х несколько возрастало и приближалось к исходным величинам (как и ТГ), а количество ЭХ уменьшалось, но все же превышало начальный уровень, при одновременном увеличении доли СЖК (на 61 % от исходных зна-

чений).

На 4 ч инкубации содержание ФЛ, Х и ДГ вновь снижалось, а ЭХ и ТГ увеличивалось без накопления количества СЖК.

Через 24 ч в аутолизирующемся белом веществе уровень ФЛ и ДГ продолжал уменьшаться и составлял соответственно 80% и 31% от исходных значений. Доля Х увеличивалась до начальных величин, а ЭХ уменьшалась при параллельном накоплении СЖК (в 2,8 раза по сравнению с исходными значениями).

Эти данные могут указывать на отсутствие защитного действия БСА в отношении аутолитических перестроек ФЛ и ДГ в белом веществе головного мозга крыс. Вместе с тем, выявлено интересное и неожиданное свойство добавленного экзогенного альбумина сдвигать фазы гидролитического распада ФЛ и ЭХ в динамике аутолиза белого вещества при сохранении колебательного характера их изменений. Так, если в условиях ФР активация распада ФЛ определялась на 1 и 24 ч инкубации, то при добавлении БСА - уже на 10 мин и, далее, на 4 и 24 ч. Причем, в присутствии БСА колебательный характер взаимопревращений между Х и ЭХ менялся на противоположный, с увеличением доли ЭХ на 10 мин и 4 ч инкубации с соответствующими реципрокными изменениями доли свободного холестерина.

Полученные результаты приводят к предположению о том, что экзогенный альбумин, как и эндогенный, возможно, имеет различное функциональное значение в аутолизирующейся ткани серого и белого вещества мозга. Не исключено, что и в аутолизирующихся ультраструктурах роль и значение альбумина также могут быть не однотипными. В сером веществе он, вероятно, может выполнять важную протекторную функцию, особенно в ранние сроки аутолиза. В белом веществе альбумин активирует деградацию ФЛ и существенно видоизменяет характер реципрокных взаимоотношений Х и ЭХ, что может иметь регуляторное значение в поддержании структурно-функциональных особенностей проводящих путей мозга при аутолизе, поскольку известно, что холестерин оказывает существенное влияние на текучесть миелиновых мембран [16, 17].

ЛИТЕРАТУРА.

1. Bazan N.C., Rodriguez de Turco E.B. (1980) Adv. Neurol. 28, 197-205.
2. Грибанов Г.А., Бурлакова Е.Б., Архипова Г.В., Ильяшенко Д.В. (1994) *Вопр. мед. химии*, N1, 49-52.
3. Sato Sinory, Ikeda Katsuchia, Yoshizaki Katsuaki (1991) Brain Res. 551, 327-330.
4. Справочник биохимика: Пер. с англ /Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. - М.: Мир, (1991)
5. Takeuchi Y., Morii H., Tamura M., Hsyaishi O., Watanabe Y. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 289, 33-38.
6. Brodersen R., Andersen S., Vorum H., Nielsen S. U., Pedersen A. O. (1990) Eur. J. Biochem. 189, 343-349.
7. Wu T.W., Gaby .D., Wu J., Sugigama H. (1991) Biochem. and Cell Biol, 69, 828-834.
8. Грибанов Г.А., Ашмарин И.П., Ильяшенко Д.В., Головкин М.Ю. (1993) Тез. докл. науч. конф. Профессорско-преподав. состава и сотрудников госбюдж. и

- хоздогов. тем.-Тверь, 128-129.
9. *Bligh E., Dyer W.A.* (1959) *Can. J. Biochem.* **37**, 911-917.
 10. *Грибанов Г.А., Сергеев С.А.* (1975) Лаб. дело. 652-655.
 11. *Плохинский Н.А.* Алгоритмы биометрии. (1980) М..
 12. *Грибанов Г.А.* (1986). Исследование биохимических превращений липидов биологических структур при аутолизе: Дисс. д-ра биол. наук.-Калинин.
 13. *Грибанов Г.А., Ильяшенко Д.В.* (1993). *Вопр. мед. Химии*, N2, 43-45.
 14. *Masuzawa Y., Sugiura T., Sprecher H., Waki K.* (1989) *Biochim. Biophys. Acta. (Lipids and Lipid Metab.)* **1005**, 1-12.
 15. *Литвинко Н.М., Кисель М.А.* Эндогенные фосфолипазы А2. (1991). Минск,
 16. *Крепс Е.М.* (1981) Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов.-Л.:Наук.,
 17. *Хухо Ф.* (1990). Нейрохимия: основы и принципы/Пер. с англ.-М.:Мир,

THE BOVINE SERUM ALBUMINE INFLUENCE ON THE CHARACTER OF THE AUTHOLYTIC ALTERATIONS OF THE LIPID COMPONENT OF RAT BRAIN GREY AND WHITE MATTERS TISSUE IN VITRO

G. A. GRIBANOV, M. U. GOLOVKO

Tver State University.

The influence of cytoprotecting concentrations of bovine serum albumin (BSA) on the autholytic alterations of rat brain white and grey matters in the physiological solution containing was investigated. In the autholysed grey matter exogenous BSA prevents the decomposition of phospholipids and the gaining the free fatty acids up to 1 hr of incubation and increased the content of cholesterol esters at the 4th and 24th hrs of autholysis. BSA increased the phospholipids breakdown at the late stages of autholysis (24 hrs). On the contrary, BSA activated the phospholipids break down in the white matter already at the early periods of incubation (10 mins). It also altered the character of cholesterol and esters pendulous interactions on the opposite one, promoting the significant increase of the latters, especially at the 10th min and 4th hr of the autholysis.

Key words: autolysis, lipid metabolism, grey and white matters of animal brain, albumine