

ОСОБЕННОСТИ АУТОЛИТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК ЛИПИДНОГО КОМПОНЕНТА МОЗЖЕЧКА БЕЛЫХ КРЫС IN VITRO

Н.В. Луцкая

С применением микротонкослойной хроматографии изучены изменения липидного компонента в ткани мозжечка крыс в динамике аутолиза in vitro в стерильном физиологическом растворе. Основным изменениям в аутолизирующемся мозжечке подвергаются фосфатидилхолины и фосфатидилсерины, содержание которых снижается с накоплением глицерофосфатов, полиглицерофосфатидов и фосфатидных кислот. Колебательный характер перестроек фосфолипидов, триацилглицеринов и эфиров холестерина в нем, вероятно, обусловлен участием как гидролазных, так и трансацилазных механизмов. Значительная стабильность липидов мозжечка при посмертном аутолизе, возможно, является отражением особенностей филогенетического формирования его мембранных структур и ферментных систем.

К настоящему времени проведено значительное число исследований, посвященных изучению вопросов эволюции липидов мозга и их изменений при различных патологических состояниях, смерти, аутолизе [2;3;6;9;10]. Однако данные об особенностях биохимических перестроек липидов в разных отделах центральной нервной системы при аутолизе, смерти в сравнительном аспекте крайне малочисленны. Вместе с тем подобные исследования могут внести ясность в некоторые вопросы, касающиеся функций липидов мозга, важные для реаниматологии, трансплантации мозга, а также биохимической эволюции мозга в целом.

Целью настоящей работы было изучение особенностей изменения липидного компонента мозжечка крыс в динамике посмертного аутолиза in vitro.

Методика. В экспериментах использовали беспородных белых крыс-самцов массой 120-140 г. опыты проводили в летний период. Мозг извлекали после декапитации на холоду. Материалом служили мелко иссеченные навески ткани мозжечка массой 20-40 мг, которые инкубировали в 1 мл 0,9 %-го раствора NaCl в асептических условиях в термостате при $t = +37^{\circ}\text{C}$. Экстракцию липидов из полученных образцов осуществляли сразу после декапитации (0 час), через 10 мин, 1, 4 и 24 часа инкубации по методу Блайя и Дайера [9].

Количественное определение суммарных липидов, изучение состава и количества отдельных липидных фракций проводили с применением микротонкослойной хроматографии [1]. Результаты обрабатывали статистически с использованием компьютерных программ Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные о количественном содержании общих липидов (ОЛ) и суммарных фосфолипидов (ОФЛ). В исходном состоянии содержание ОЛ в ткани мозжечка составило 4392 мг%. В динамике аутолиза их количество снизилось к 1-му ч до 3354 мг%, и эта тенденция сохранялась и в более поздние сроки наблюдения. Достоверных изменений общего содержания фосфолипидов не отмечалось, однако в первые 10 мин их количество несколько снизилось и возросло к 1 ч инкубации. Характер аутолитических перестроек отдельных липидных фракций имеет ряд особенностей и представлен в табл. 2-3.

Таблица 1

Динамика содержания ОЛ и ОФЛ мозжечка крыс при аутолизе *in vitro*

	Сроки аутолиза				
	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
ОЛ, мг%	4392±299	4604±347	3354±352*	3078±105*	3223±103
ОФЛ, мг%	191±13	166±18	224±32	177±18	183±17

Примечание. Здесь и далее: * - достоверные различия по сравнению с исходными значениями (0 ч), $P \leq 0,05$, $n=4-9$.

При анализе липидного состава мозжечка в исходном состоянии (табл. 2) выявлено, что около половины всех липидов приходится на долю фосфолипидов (ФЛ). Фракции холестерина (Х) и его эфиров (ЭХ) составляют примерно 26 % от суммы общих липидов с преимущественным содержанием свободного холестерина. Около 13 % представлено свободными жирными кислотами (СЖК); диацилглицерина (ДГ) и триацилглицерина (ТГ) – 4,0 % и 6,7 % соответственно.

Основным изменениям в динамике аутолитического процесса в ткани мозжечка подвергаются ФЛ, ТГ и ЭХ. При этом выявлен колебательный характер перестроек ФЛ и ТГ, изменяющихся в противоположных фазах (снижение уровня ФЛ и нарастание ТГ, и наоборот). Уже к 1 ч аутолиза содержание ФЛ падает на 17,3 % от исходных значений и несколько возрастает к 4 ч, но вновь уменьшается в последующие сроки инкубации с параллельным увеличением доли СЖК (к 24 ч). При этом количество ТГ увеличивается в 1,5 и 1,8 раза к 1 и 24 ч аутолиза соответственно. Значительные изменения отмечены и для фракции ЭХ, содержание которых к 1 ч инкубации возрастает почти в 2 раза. Фракции ДГ и Х в ходе аутолиза изменяются мало.

В составе фосфолипидов мозжечка крыс обнаружены все основные группы, встречающиеся в головном мозге [7]. Как видно из табл. 3, основная масса ФЛ мозжечка представлена фосфатидилхолинами (ФХ) и фосфатидилэтаноламинами (ФЭА). Достаточно высока и концентрация фосфатидилсерина (ФС). Содержание сфингомиелинов (СФМ) – около 8 %. Количество остальных фракций – глицерофосфатов (ГЛФ), лизофосфолипидов (ЛФЛ), фосфатидинозитидов (ФИ), фосфатидных кислот (ФК), полиглицерофосфатидов (ПГФ) было в пределах 3,8-5,9 % каждая.

При аутолизе ткани мозжечка *in vitro* основными фракциями ФЛ, содержание которых достоверно уменьшалось, являются ФХ, причем только на поздних сроках (24 ч), и ФС – во все сроки наблюдения. Снижение их относительной концентрации сопровождается нарастанием доли ФК, а также ГЛФ и возможной трансформацией последних в ПГФ (в поздние сроки). Содержание остальных фракций существенно не менялось.

Таблица 2

Изменения относительного содержания общих липидов мозжечка крыс в динамике аутолиза *in vitro* (% от суммы)

Фракции	Сроки аутолиза				
	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
ФЛ	50,2±1,3	45,6±2,5	41,5±2,4*	46,7±1,6	42,9±2,0*
ДГ	4,0±0,7	3,5±0,2	7,8±1,3	5,8±0,3	6,0±1,3
Х	19,5±1,8	23,5±3,3	17,2±1,9	17,8±0,9	14,7±1,1
СЖК	13,0±1,7	11,6±1,8	11,0±0,3	13,8±0,9	15,1±1,3*
ТГ	6,7±0,6	7,1±0,9	10,4±0,4*	7,3±0,6	12,2±1,9*
ЭХ	6,6±0,9	8,7±1,0	12,1±1,2*	8,6±0,7*	9,1±1,1

Таблица 3

Изменения содержания отдельных фракций фосфолипидов ткани мозжечка крыс при аутолизе *in vitro* (% от суммы фракций)

Фракции	Сроки аутолиза				
	0 ч	10 мин	1 ч	4 ч	24 ч
ГЛФ	4,5±0,6	3,4±0,2	7,0±1,3	6,5±1,2	7,8±0,7*
ЛФЛ	5,0±0,7	3,5±0,9	5,2±0,5	4,5±0,6	6,3±0,7
СФМ	7,9±1,1	8,5±0,7	10,2±1,3	9,0±1,3	9,5±1,4
ФХ	30,4±2,4	26,9±0,6	26,0±1,2	31,3±1,2	23,1±2,3*
ФИ	5,9±0,9	7,4±0,7	7,5±0,6	6,8±1,1	9,4±1,5
ФС	13,5±1,7	16,5±1,6	9,0±0,8*	9,0±1,1*	7,3±3,7*
ФЭА	24,3±1,8	21,4±0,7	22,3±1,3	21,2±1,3	21,0±1,9
ПГФ	4,7±0,4	3,8±0,2	7,7±0,6*	6,5±0,6*	7,3±1,0*
ФК	3,8±0,8	8,6±0,6*	5,1±0,2	5,2±0,4	8,3±0,4*

Выявленные особенности в характере изменений основных липидных и фосфолипидных фракций в динамике посмертного аутолиза свидетельствуют о наличии сложных механизмов превращений липидов в исследуемом отделе головного мозга.

Отмеченный разнофазный колебательный характер изменений ФЛ и ТГ в ткани мозжечка в динамике аутолиза, сопровождающийся снижением уровня ФС уже в ранние сроки и ФХ – в поздние (без накопления ЛФЛ), вероятно, свидетельствует о наличии в данном отделе скорее трансацилазных, чем гидролазных перестроек липидного компонента.

Таким образом, полученные результаты указывают на принципиально различную динамику аутолитической деструкции липидного компонента ткани мозжечка и других отделов головного мозга крыс, в частности серого и белого вещества коры больших полушарий, изученных ранее [4;5]. Выявленные различия в динамике перестроек липидного компонента в исследованных аутолизирующихся структурах мозга связаны, вероятно, с разновременной активацией эндогенных гидролазных и трансацилазных систем в отношении разных классов липидов, что, на наш взгляд, можно считать отражением особенностей филогенетического формирования мембранных структур и ферментных систем в указанных отделах центральной нервной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грибанов Г.А. Методы анализа липидов: Лабораторный практикум для студентов химико-биологического факультета. Калинин, 1980.
2. Грибанов Г.А., Бурлакова Е.Б., Ильяшенко Д.В. Липиды синаптических мембран головного мозга крыс при аутолизе // Вопр. мед. химии. 1994. Т. 40, № 1. С. 49-51.
3. Грибанов Г.А., Лещенко Д.В., Головкин М.Ю. и др. Влияние острой гипобарической гипоксии на аутолитические изменения липидов серого и белого вещества головного мозга белых крыс // Авиакосмич. и эколог. медицина. 2001. № 4. С.53-57.
4. Грибанов Г.А., Лещенко Д.В., Головкин М.Ю. Изменения фосфолипидов серого и белого вещества головного мозга крыс в процессе аутолиза *in vitro* под влиянием острой гипобарической гипоксической гипоксии // Биомед. химия. 2004. Т. 50, № 2. С. 192-197.
5. Ильяшенко Д.В. Аутолитические изменения липидов различных отделов и ультраструктур головного мозга крыс: Дис. ... канд. биол. наук. Тверь, 1995.

6. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л., 1981.
7. Хухо Ф. Нейрохимия: основы и принципы. М., 1990.
8. Bligh E., Dyer W.A. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. 1959. V. 37, № 8. P.911-917.
9. Kan Per J.N., Mclartney D.G., Singh I. et al. Acidic phospholipids inhibit the phospholipase D activity of rat brain neuronal niclei // FEBS Lett. 1996. V. 383, № 1-2. P.6-8.
10. Such M. Brain death // J. Amer. Med. Assoc. 1995. N 4. P.70-81.

FEATURES OF THE LIPID COMPONENTS AUTOLYTIC ALTERATIONS OF RAT CEREBELLUM AND IN VITRO

N.V. Lutskaya

The lipid component alteration in the tissue of rat cerebellum in the autholysic dinamic in vitro in the sterilized phisiological solution has been studied with the aid of thin layer chromatography. In the cerebellum phosphatidylcholines and phosphatidylserines are subjected to the main changes, the content of which decreases with the increase of the free fatty acid, glycerophosphates, polyglycerophosphatides and phosphatidic acids. Pendulous character of phospholipids, triglycerides and cholesterol alteration is determined, perhaps, by the participation of not only hydrolytic, but the transacylas mechanisms. The significant stability of the general lipids during the postmorten autholysis in the cerebellum, probably, is a reflection of fetures of its phylogenetic forming of its membrane structures and enzymes system.