

С.С. ОСОЧУК, Н.Ю. КОНЕВАЛОВА

**ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОЙ КОМПОЗИЦИИ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ**УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Эндоплазматический ретикулум печени крыс обеспечивает формирование и экспорт в кровь липидно-белковых комплексов и таким образом участвует в функционировании липидтранспортной системы. В литературе отсутствуют сведения об изменении липидного спектра эндоплазматического ретикулума печени при генерализованных воспалительных процессах. В настоящей работе исследовали изменения фосфолипидного спектра и состава жирных кислот лизофосфатидов, фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов микросом печени белых беспородных крыс при экспериментальном перитоните. Обнаружены признаки увеличения поставки фосфолипидов митохондриям печени, возможно, для обеспечения их функциональной активности. Отмечено увеличение включения насыщенных жирных кислот в фосфолипиды, что способно активировать $\Delta 6$ -десатуразы и продукцию эндогенных полиненасыщенных жирных кислот, а так же активацию цитохрома P450 и усиление детоксикации ксенобиотиков. Выявлены признаки увеличения экспорта дигомо-г-линоленовой кислоты и снижения поставки арахидоновой кислоты, что может быть одним из факторов контроля воспалительного процесса посредством продукции простаноидов, продуцирующихся из дигомо-г-линоленовой кислоты, обладающих меньшей активностью, чем простаноиды синтезирующиеся из арахидоновой кислоты.

Одним из наиболее серьезных осложнений абдоминальной хирургии, в 70 – 100% случаев ведущим к летальному исходу [2], является перитонит, изучение этиологии и патогенеза которого является актуальным до настоящего времени. Известно, что крысы высокоустойчивы к развитию воспалительного процесса. Исследование метаболизма крыс при воспалительном процессе позволит найти способы увеличения резистентности к воспалению. Микросомальный аппарат клеток печени играет важную роль в процессе биосинтеза экспортируемых в кровь соединений, в том числе, необходимых для формирования липопротеиновых комплексов и поставки перифе-

рическим клеткам холестерина, фосфолипидов [7]. С мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭПР) ассоциирована система цитохрома P450, играющего важную роль в детоксикации ксенобиотиков [7]. При генерализованных воспалительных процессах осуществляется модификация структуры липидтранспортной системы и поставки холестерина надпочечникам [3]. Однако практически отсутствуют сведения об изменениях строения ЭПР при генерализованных воспалительных процессах. Целью настоящей работы является исследование фосфолипидного состава и жирнокислотного спектра лизофосфатидов (ЛФ), фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэ-

таноламинов (ФЭА) микросом клеток печени белых беспородных крыс при экспериментальном перитоните.

Материалы и методы

Перитонит моделировали однократным внутривенным введением 4 млрд. микробных тел *E. Coli* (штамм O-26) пятнадцати белым беспородным крысам-самцам средней массой тела 180 – 200 гр. Контролем служили 12 интактных крыс. Животных декапитировали через 4 часа после инъекции *E. Coli*. Печень перфузировали охлажденным физиологическим раствором и сохраняли до обработки в жидком азоте. Микросомы печени выделяли низкоскоростным центрифугированием, описанным в работе Baker S. и соавторов [4]. Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (соотношение 2:1 по объему). Фосфолипиды разделяли двумерной тонкослойной хроматографией [1], собирали в огнеупорные пробирки и минерализовали в хлорной кислоте при температуре 220 – 240°C. Процентное содержание оценивали по неорганическому фосфату [5]. Для определения спектра жирных кислот ЛФ, ФХ и ФЭА липидный экстракт разделяли двумерной тонкослойной хроматографией [1]. Фракции ЛФ, ФХ и ФЭА собирали в вials, метилировали 0,75N серной кислотой

в метаноле при температуре 65°C в течение 24 часов. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Экстракт упаривали досуха в токе азота, немедленно растворяли в ацетоне и анализировали на газовом хроматографе Цвет 500М (колонка длиной 2 м, набита реоплекс 400, скорость потока газа-носителя (He) – 30 мл/мин, детектирование пламенно-ионизационным детектором по стандартам метилловых эфиров жирных кислот (Sigma)). Соотношения детектированных жирных кислот рассчитывали по площади пиков и выражали в процентах. Результаты обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

Оценка фосфолипидного состава микросом печени (таблица 1) продемонстрировала достоверное снижение количества полиглицерофосфатидов (ПГФ) ($p=0,0005$), одним из представителей которых является кардиолипин – фосфолипид, характерный в большей степени для митохондрий [1]. Данное изменение может быть обусловлено переходом кардиолипинов в состав митохондрий для обеспечения их функциональной активности. Исследование жирных кислот (ЖК) фосфолипидов (ФЛ) показало, что сумма полиненасыщенных жир-

Таблица 1

Спектр фосфолипидов микросом и активность антиоксидантных ферментов печени

	ЛФ	СФ	ФХ	ФЭА	ПГФ
Контроль	4,81±0,34	7,1±0,67	57,17±2,2	25,86±2,39	6,02±0,38
<i>E. Coli</i> 4 часа	4,49±0,38	7,53±0,69	55,89±2,06	28,74±2,35	3,26±0,53**

ных кислот (ПНЖК) всех ФЛ снижалась ($p < 0,0001$). В фосфатидилхолинах (ФХ) (таблица 2) росла сумма насыщенных жирных кислот (НЖК) и отношение сумм НЖК/ПНЖК ($p = 0,02, 0,04$). В ЖК спектре ФХ (таблица 3) сумма НЖК увеличивалась за счет пальмитиновой кислоты (С16:0) ($p = 0,002$), а снижение суммы ПНЖК обуславливалось падением содержания линоленовой (С18:2) и арахидоновой (С20:4) кислот ($p = 0,004, 0,008$). Рост содержания пальмитиновой кислоты может обуславливаться активацией пальмитатсинтазного комплекса. Снижение содержания линоленовой и арахидоновой кислот, вероятно, обусловлено активацией ПОЛ, а также использованием как предшественников метаболически активных продуктов (липокисны).

ФХ являются основными ФЛ мембран, поэтому снижение содержания их ПНЖК способно увеличить вязкость мембран ЭПР и, как следствие, должно привести к кон-

формационным изменениям ассоциированных с ними белков и модифицировать их функциональную активность. При росте микровязкости мембран ЭПР ключевой фермент биосинтеза эндогенных ПНЖК $\Delta 6$ -десатураза выталкивается на поверхность мембраны, освобождается ее активный центр, и фермент активируется [4]. Обнаруженный дефицит ПНЖК должен привести к активации $\Delta 6$ -десатуразы и продукции ПНЖК. ФХ так же участвуют в регуляции активности цитохрома Р450.

Изменение физико-химических свойств ФХ, способно изменить активность этой важной ферментативной системы. Показано, что L- α -1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин и L- α -1,2-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, введенные в микроокружение цитохрома Р450, увеличивали его активность [7]. ФХ и ФЭА этерифицированные короткоцепочечными ЖК (С8-12) увеличивали активность этого фермента на

Таблица 2

Изменения сумм жирных кислот и их отношений в составе фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов лизофосфатидов микросом печени при экспериментальном перитоните

	УНЖК	УМНЖК	УПНЖК	УНЖК / УПНЖК
Фосфатидилхолины %				
Контроль	83,45±2,08	2,38±0,62	13,61±1,59	6,19±0,88
4 часа	89,71±2,49 $p_i = 0,02$	2,64±0,66	6,98±1,99 $p_i = 0,01$	13,66±4,39 $p_i = 0,04$
Фосфатидилэтаноламины %				
Контроль	71,84±5,05	0,94±0,24	26,49±5,01	2,8±0,73
4 часа	93,59±1,53 $p_i = 0,002$	0,37±0,15 $p_i = 0,02$	4,81±1,66 $p_i = 0,002$	21,23±7,93 $p_i = 0,016$
Лизофосфатиды %				
Контроль	53,47±4,96	22,05±1,96	22,03±3,99	2,51±0,7
4 часа	81,36±4,31 $p_i = 0,001$	1,63±0,32 $p_i < 0,0001$	16,07±4,29	5,37±1,78

**Спектр жирных кислот фосфатидилхолинов и лизофосфатидов
микросом печени**

	ЛФ		ФХ		ФЭА	
	Контроль	Е. Coli 4 часа	Контроль	Е. Coli 4 часа	Контроль	Е. Coli 4 часа
14:0	19,7±1,34	12,1±1,36**	1,2±0,19	1,32±0,2	0,82±0,1	4,56±0,8**
15:0	4,0±1,18	2,35±0,59	1,2±0,25	0,93±0,2	0,64±0,14	1,23±0,24
16:0	24,0±2,02	59,09±2,24**	58,4±0,69	64,4±0,5**	44,89±0,34	46,38±1,27
16:1	7,26±0,25	Следы	Следы	Следы	Следы	Следы
17:0	2,43±0,57	0,92±0,17**	0,55±0,07	0,65±0,09	0,72±0,1	1,21±0,15
17:1	2,29±0,29	0,54±0,09**	0,27±0,05	0,17±0,03	0,33±0,06	0,37±0,08
18:0	5,72±1,0	7,81±1,01	22,64±1,83	23,01±1,95	25,48±2,54	41,41±2,72**
18:1	11,1±0,55	0,6±0,05**	2,1±0,3	2,47±0,34	0,6±0,07	Следы**
18:2	2,84±0,62	Следы**	6,01±0,76	1,36±0,17**	6,41±0,8	0,72±0,08**
20:3	19,18±2,93	0,07±0,01**	4,1±0,99	5,56±1,3	4,07±0,9	4,08±1,04
20:4	Следы	16,0±2,46**	3,45±0,69	0,05±0,01**	16,0±2,92	Следы**

50-124%. Вышеизложенное свидетельствует о том, что увеличение включения в ФХ пальмитата (С16:0) может увеличить активность цитохрома Р450.

Таким образом, в ФХ происходят сдвиги, способные увеличить активность Δ6-десатуразы и цитохрома Р450, модифицировать биосинтез эндогенных ПНЖК и обезвреживание ксенобиотиков.

В ЖК ФЭА (таблицы 2, 3), сумма НЖК и отношение сумм НЖК/ПНЖК увеличивались ($p=0,002$, $0,016$), а суммы МНЖК и ПНЖК были ниже, чем у интактных животных ($p=0,02$, $0,002$). В отличие от ФХ, увеличение суммы НЖК обуславливалось возрастанием содержания миристиновой (С14:0) и стеариновой (С18:0) кислот ($p=0,009$, $0,012$), а снижение сумм МНЖК и ПНЖК – уменьшением до следовых количеств содержания олеиновой (С18:1) и арахидоновой (С20:4) кислот. Такие изменения также вносят свой вклад в увеличение вязкости мембран ЭПР и могут способствовать увеличению активности цитохрома Р450 [7].

В ЖК ЛФХ (таблицы 2, 3) увеличена сумма НЖК ($p=0,001$) и уменьшена сумма МНЖК ($<0,0001$), что обуславливалось воз-

росшим содержанием пальмитиновой кислоты (С16:0) ($p=0,0003$), снижением содержания миристиновой (С14:0) ($p=0,01$) и олеиновой (С18:1) кислот ($p<0,0001$). Содержание дигомо-г-линоленовой кислоты (ДГЛК) (С20:3) падало ($p=0,02$), а содержание арахидоновой кислоты (20:4) росло. Сравнение ЖК ФХ и ЛФХ показало, что из ФХ ФЛ-А2 изымались главным образом миристиновая (С14:0), пальмитиновая (С16:1), олеиновая (С18:1) кислоты, а также ДГЛК (С20:3). Известно, что ЭПР гепатоцитов осуществляет синтез ФЛ на своей цитозольной стороне. Для экспорта ФЛ при помощи флипаз переносятся на внутреннюю поверхность ЭПР, а фосфолипаза-А2 ускоряет этот процесс [9]. Вероятно, экспорт ФЛ, этерифицированных ДГЛК (С20:3), усиливается, а этерифицированных арахидоновой кислотой (С20:4) – замедляется. Учитывая, что крысы являются высоко устойчивыми к воспалительному процессу, а простаноиды, синтезирующиеся из ДГЛК, обладают менее выраженной активностью, чем простаноиды, синтезирующиеся из арахидоновой кислоты [8], можно сделать вывод, что снижение экспорта арахидоновой

кислоты и увеличение экспорта ДГЛК может расцениваться как способ регуляции активности воспалительного процесса у крыс.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Из состава ЭПР, возможно для обеспечения возросшей функциональной активности митохондрий, изымаются ПГФ.

2. Изменения ЖК ФХ и ФЭА способствуют увеличению активности цитохрома P450 и Δ6-десатуразы.

3. Отмечены признаки увеличения экспорта вновь синтезированной ДГЛК, возможно, для ограничения активности воспалительного процесса через простаноиды первого ряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кейтс, М. Техника липидологии /М. Кейтс. - Москва.: "Мир," 1975. - 358с.
2. Косинец, А.Н. Профилактика и лечение гнойно-воспалительных осложнений при экстренных операциях на органах брюшной полости (клинико.-экспериментальное исследование): дисс. д-ра мед. наук: 14.00.27 / А.Н. Косинец. – Витебск, 1994. -510 л.
3. Осочук, С.С.Изменения липидтранспортной системы при экспериментальном пе-

ритоните у крыс / С.С. Осочук // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. - № 8.- С. 169-172.

4. Титов, В.Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот / В.Н. Титов. – Москва: "АЛТУС", 2002. – 495 с.

5. A universal reagent for fosfolipids analisis / V.E. Vaskowsky [et al.] // J. Chromatogr. - 1975. - Vol. 114. - P. 129-141.

6. Baker, S. Low speed preparation of microsomes: a comparative study / S. Baker, L. Coons, E. Hodgson //Chem. Biol. Interact. - 1973. - Vol. 6. - P. 307-316.

7. Chul-Ho, Yun Conformational Change of Cytochrome P450 1A2 Induced by Phospholipids and Detergents / Yun Chul-Ho, Song Maengseok, Kim Hyoungman // JBC. – 1997. – Vol. 272, № 32. - P. 19725-19730.

8. Li, Zhou. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues / Zhou Li Nilsson Eke // Journal of Lipid Research. – 2001. - Vol. 42. - P.1521-1542.

9. Sathyanarayana, N. Gummati Transbilayer Movement of Dipalmitoylphosphatidylcholine in Proteoliposomes Reconstituted from Detergent Extracts of Endoplasmic Reticulum / N. Gummati Sathyanarayana, Menon Anant K. // J. Biol. Chem. – 2002. - Vol. 277, № 28. – P. 25337-25343.

Поступила 11.04.2006 г.