

A 03.00.04
K-147

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ

Կենսաքիմիայի Ինստիտուտ

Ղազիմյան Աննա Արշալույսի

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀԵՊԱՏՈՅԻՏՆԵՐԻ
ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ԳՈՅԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴ-
ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՓՈԽՀԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՎԱԳՈՏՈՄԻԱՅԻ
ՊԱՅՍԱՆՆԵՐՈՒՄ

Գ.00.04 Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ը

Ե Ր Ե Վ Ա Ն - 1999

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
Институт Биохимии

Казинян Анна Аршалуйсовна

ФОСФОЛИПИД-ФОСФОЛИПИДНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В
СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ ГЕПАТОЦИТОВ БЕЛЫХ
КРЫС ПРИ ВАГОТОМИИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.00.04, Биохимия

Е Р Е В А Ն - 1999

Ատենախոսության բեման հաստատված է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլյար Կենսաբանության Ինստիտուտի Գիտական խորհրդի ընդլայնված նիստում 1997 թ. հունիսի 16-ին (արձանագրություն թիվ 5)

Գիտական ղեկավարներ՝ ՀՀ ԳԱԱ Ակադեմիկոս Կ.Գ. Ղարազոզյան կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Ա. Հովեյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ռ.Մ. Սրապիոնյան կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ա.Ա. Թշուռյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի Պետական Համալսարանի կենսաբիմիայի ամբիոն

Պաշտպանությունը կայանալու է « 3 » 11 1999թ. ժ. 11⁰⁰ -ին

ՀՀ ԳԱԱ Հ.Խ.Բունյաթյանի անվ. Կենսաբիմիայի ինստիտուտին կից 042 մասնագիտացված խորհրդի նիստում (375014, Երևան-14, Պարույր Սևակի 5/1)

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ինստիտուտի գրադարանում

Մեղմագիրն առարված է « 1 » 10 1999թ.

Մասնագիտացված խորհրդի գիտական քարտրվար կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ա.Ա. Սիմոնյան

Тема диссертации утверждена на расширенном заседании Ученого совета Института Молекулярной Биологии НАН РА 16 июня 1997 г. (протокол No 5)

Научные руководители: академик НАН РА К.Г. Карагезян
канд. биол. наук. Г.А. Овезян
Официальные оппоненты: доктор. биол. наук, проф. Р.М. Срапионян
доктор. биол. наук, проф. А.А. Трчунян
Ведущая организация: каф. Биохимии Ереванского Государственного Университета

Защита состоится « 3 » 11 1999г. в 11⁰⁰ ч. на заседании специализированного совета 042 при Институте Биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА (375014, Ереван-14, ул. Паруйра Севака 5/1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Биохимии.

Автореферат разослан « 1 » 10 1999г.

Ученый секретарь специализированного совета, доктор биол. наук, проф. А.А. Симонян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение молекулярно-клеточных механизмов регуляции адаптационно-приспособительного действия вегетативной нервной системы на функционирование различных тканевых систем и крови как внутренней среды организма имеет важное как фундаментальное, так и прикладное значение в комплексе важнейших задач современной медико-биологической науки. С отмеченной точки зрения наиболее актуальным и первостепенным является выявление роли расстройств парасимпатической нервной системы и главным образом функционального состояния блуждающего нерва в возникновении, развитии и генерализации многих патологических состояний желудочно-кишечного тракта, в частности в формировании молекулярных механизмов патогенеза язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки как результат срывов общей адаптации (Комаров Ф.И., 1996). В этом звене особо важное место занимает состояние структурной организации и функциональной активности субклеточных элементов гепатоцитов, а также интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов и систем антирадикальной защиты клетки, ставшие предметом наших специальных исследований по теме настоящей диссертации.

Общезвестно, что одним из современных радикальных методов лечения указанных болезненных состояний организма является ваготомия, как trunkальная, так и селективная, хотя и по сей день остается открытым вопрос о характере поражения клеток и субклеточных элементов органов пищеварительного тракта в том числе и печени. Более того, ваготомия, приводящая к нарушению адаптационно-приспособительных возможностей клеток слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, сама по себе, может стать причиной как рецидивов язв, так и необратимости расстройств печеночной функции, если таковые не найдут своего восстановления как можно в максимально сжатые сроки. Поэтому актуальность предпринятого исследования очевидна и обретает особое звучание как в плане фундаментальных поисков, так и с точки зрения их чрезвычайно важного прикладного значения.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей изменений качественно-количественного состава фосфолипидов, интенсивности течения процессов перекисления липидов митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов в различные периоды после ваготомии (1, 3, 7, 30 и 90 дни), как показателей динамики упорядочения и нормализации расстройств компенсаторно-приспособительной функции организма при ваготомии, обусловленной в известной степени нарушениями структурно-функциональной организации печеночных образований и их метаболической активности.

Для осуществления отмеченной цели были запланированы следующие задачи в направлении изучения нарушений:

- 1) качественного набора и количественного содержания индивидуальных фракций фосфолипидов митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов в различные сроки после ваготомии,
- 2) суммы нейтральных, кислых представителей этих соединений и их общей суммы в отмеченных субклеточных образованиях гепатоцитов,
- 3) коэффициентов отношений суммы нейтральных фосфолипидов к сумме кислых,
- 4) интенсивности течения процессов перекисного окисления липидов в аскорбат- и NADPH-зависимых системах перекисления митохондриальной, микросомальной фракций гепатоцитов в различные сроки после ваготомии.

Особо акцентировалась необходимость в установлении феномена время-зависимости обратимости всех поименованных отклонений в картине фосфолипидного метаболизма при ваготомии с тенденцией к их полному восстановлению.

Научная новизна работы состоит в выявлении и изучении особенностей нарушений метаболизма фосфолипидов всех категорий и изменений интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов в митохондриальной

фракции и микросомальной фракциях гепатоцитов на 1, 3, 7, 30 и 90-ые дни после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии у белых крыс.

На основании полученных результатов сделан вывод о существенных расстройствах, возникающих в компенсаторно-приспособительной функции организма, наиболее отчетливо проявляющихся на уровне гепатоцитов и их главных субклеточных образований - митохондриальной и микросомальной фракций. Эти данные свидетельствуют о первостепенной важности поиска эффективных мер по нивелированию установленных срывов в реакциях метаболизма фосфолипидов, имеющих решающее значение в формировании и стабилизации норм функционирования гепатоцитов и печеночной ткани в целом в условиях ваготомии.

Установлена специфичность в разнонаправленности качественно-количественных сдвигов фосфолипидов в митохондриальной и микросомальной фракциях гепатоцитов как показателя, чрезвычайно чувствительного по своей специализированности и узкой дифференцированности в плане функциональной активности изученных органов, наиболее демонстративно проявляющихся в экстремальных ситуациях организма.

Они являются красноречивым подтверждением на морлекулярно-биологическом уровне фундаментальности учения И.П.Павлова об адаптационно-трофической роли нервной системы, в частности вегетативной, в формировании биологической кооперированности основ физиологического статуса слаженного функционирования всех органов и систем организма.

Практическое значение работы вытекает из результатов фундаментальных исследований, основательно раскрывающих перед специалистами прикладной медицины неоспоримость факта негативного действия двусторонней поддиафрагмальной ваготомии, широко рекламируемой как современный неопределимый эффективный метод лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Оценивая с пониманием результативность этого метода в терапии отмеченных гастро-энтерологических заболеваний, следует одновременно проявить определенное отношение и к борьбе с определенными сторонами вредоносного действия указанного метода. Они отчетливо проявляются в отношении жизненно важных молекулярно-биологических механизмов регуляции клеточной активности, в данном случае гепатоцитов. Установленные нами нарушения метаболизма фосфолипидов в субклеточных образованиях гепатоцитов, оказавшись обратимыми к 90-у дню после ваготомии, тем не менее, не демонстрируют картины полной нормализации их даже спустя 3 месяца после моделирования выключения парасимпатического звена вегетативной нервной системы. Любое промедление в направлении принятия соответствующих мер по восстановлению утраченных метаболических функций печеночной клетки может оказаться необратимым и, следовательно, явиться причиной всевозможных тяжелых осложнений печеночной функции. Поэтому в целях максимальной оптимизации и рекламирования метода двусторонней поддиафрагмальной ваготомии как эффективного терапевтического подхода к лечению язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки необходимо изыскать наиболее эффективные современные подходы по восстановлению и стабилизации процессов тканевого метаболизма фосфолипидов на уровне гепатоцитов и их органелл.

Результаты этих исследований наводят на мысль о необходимости предпринятия необходимых мер предосторожности при выборе ваготомии как одного из современных радикальных методов лечения, с отдачей предпочтения способу тонкой селективной ваготомии, нежели трункальной.

Основные положения диссертации выносимые на защиту.

1) Демонстрация закономерностей изменений качественного и количественного состава индивидуальных фосфолипидов митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов на различных этапах после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

2) Значение парасимпатической иннервации в регуляции процессов межфракционных изменений функционально различных категорий фосфолипидов в

исследованных субклеточных образованиях гепатоцитов в различные сроки после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

3) Динамика изменений общей суммы фосфолипидов, коэффициентов отношений суммы их нейтральных представителей к сумме кислот в изученных субклеточных элементах гепатоцитов на разных этапах развития ваготомии.

4) Изменение интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов в неферментативной и ферментативной системах перекисеобразования в митохондриальной и микросомальной фракциях гепатоцитов в изученных условиях ваготомии.

5) Демонстрация взаимосвязи и взаимообусловленности между нарушениями метаболизма фосфолипидов и интенсивностью течения процессов перекисеобразования при формировании внутриклеточных структурно-функциональных и метаболических преобразований печеночной ткани на фоне ваготомии.

Апробация работы. Основные результаты экспериментальных исследований по настоящей диссертации представлены на 15-ом собрании Международного Общества Нейрохимии - ISN (Киото, Япония 1995), 1-ой Республиканской конференции Армянского отделения Международной Организации по исследованию мозга IBRO (Ереван, РА, 1996), 1-ой Республиканской конференции "Медико-биологические проблемы стресса" (Ереван, РА, 1997), Конференции, посвященной 30-летию основания Института Молекулярной Биологии НАН РА (Ереван, РА 1998), Международном симпозиуме "Диагностическая медицина" (Ереван, РА 1999).

Обсуждение диссертационной работы состоялось на заседании расширенного Ученого совета Института Молекулярной Биологии НАН РА (1999).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

Структура диссертации. Диссертация оформлена в традиционном стиле, изложена на 118 стр. русского компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, общих выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 11 рисунками, список цитированной литературы объединяет 174 названий на русском и 175 - на иностранных языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методика моделирования двусторонней поддиафрагмальной ваготомии у белых крыс в различные этапы после предпринятой операции

Исследования проводили на 365 белых крысах-самцах, массой 180-200 г, содержащихся на ординарном пищевом рационе.

Моделирование двусторонней поддиафрагмальной ваготомии производили оперативным путем под легким эфирным наркозом, обнажением с помощью срединного разреза брюшной полости в области нижнего отдела пищевода и иссечением обоих блуждающих нервов с удалением их на расстоянии 2 мм. Умерщвление предварительно голодавших в течение 12 ч животных осуществляли методом декапитирования их под легким эфирным наркозом на 1, 3, 7, 30 и 90 дни после моделирования двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

После отделения, очистки и промывки печеночной ткани охлажденным физиологическим раствором и отделения гепатоцитов на холоду в максимально сжатые

2800-99

сроки, приступали к изоляции МХФГ и МСФГ методом дифференциального центрифугирования (Арчаков А.И. и др., 1968) (при 14000 g в центрифуге К-24 в течение 20 мин и 105000 g в центрифуге VAC-601 в течение 60 мин соответственно). Чистоту выделенных субклеточных образований гепатоцитов контролировали методом электронномикроскопического анализа.

Методика экстракции, фракционирования, идентификации и количественного определения всех категорий фосфолипидов в митохондриальной и микросомальной фракциях гепатоцитов белых крыс в различные периоды после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии

Экстракцию ФЛ из МХФГ и МСФГ производили известным классическим методом (Folch J. et al., 1957) в модификации К.Г. Карагезяна (Карагезян К.Г., 1972), состоявшей в получении обезвоженных ацетоновых порошков исследуемого материала как важного условия в достижении максимально эффективного извлечения ФЛ из первоисточников.

Фракционирование индивидуальных представителей ФЛ осуществляли методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля на фирменных пластинках "MERC", (ФРГ).

Идентификацию отдельных пятен фракций ФЛ производили с помощью высокоочищенных стандартов ("SIGMA" Chemical Company, США), а количественное определение указанных соединений осуществляли спектрофотометрически и выражали в мкг минерализованного липидного фосфора (Fiske C.H. et al., 1925) на 1 мг сухого вещества исследуемого материала или на мг белка (Lowry D.H. et al., 1951) по каждому индивидуальному представителю ФЛ.

Методика определения интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов по выходу малонового диальдегида в ферментативной и неферментативной системах перекисления

Принцип метода основан на реакции между МДА и ТБК, протекающей при высокой температуре и кислых значениях pH (Владимиров Ю.А. и др., 1972; Бенисович В.И. и др., 1973). С отмеченной целью суспензию мембран инкубировали: 1) в случае изучения интенсивности течения перекисобразовательного процесса в ферментативной (NADP.H-зависимой) системе в смеси, состоящей из 0.1 мл суспензии мембран, 0.3 мл 12×10^{-6} М соли Мора, 0.3 мл 2×10^{-4} М пиррофосфата, 0.3 мл 1 мМ р-ра NADP.H. 2) в случае же изучения интенсивности течения перекисобразовательного процесса в неферментативной (аскорбат-зависимой) системе - в смеси, состоящей из 0.1 мл суспензии мембран, 0.3 мл 40 мМ ТРИС-HCL буфера (pH 7.4), 0.3 мл 0.8 мМ р-ра аскорбиновой кислоты, 0.3 мл 12×10^{-6} М соли Мора. Общий объем смеси составлял 1 мл. Инкубацию проводили в водяной бане при 37°C в течение 30 мин при постоянном встряхивании

содержимого пробирок; реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 30% р-ра ТХУ, осадок удаляли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин, смесь надосадочной жидкости и ТБК нагревали при 100°C в течение 10 мин, интенсивность развивающейся окраски розового хромогена, прямо пропорциональную концентрации МДА, измеряли спектрофотометрически при длине волны 535 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка особенностей количественных изменений различных категорий фосфолипидов в митохондриальной и микросомальной фракциях гепатоцитов белых крыс в различные периоды после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о развитии как в МХФГ, так и в МСФГ в различные периоды после ваготомии существенных количественных изменений НФЛ и КФЛ с проявлением определенных признаков стабильности в характере наблюдающихся сдвигов, как это отражено в соответствующих рисунках. Примечательна главная деталь, характеризующая активизирующее действие ваготомии на функциональное состояние ФЛазы А₂. Она проявляется в виде чувствительного увеличения содержания ЛФХ как продукта деацилирования ФХ. Примечательно, что, как показано на рис 1, в течение первой недели после ваготомии в МХФГ и МСФГ прослеживается в среднем

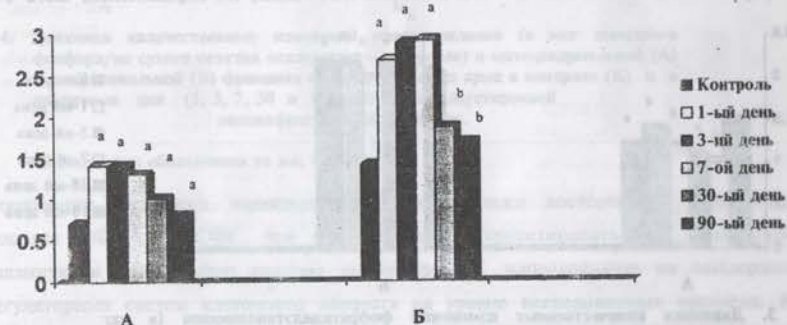


Рис. 1. Динамика количественных изменений лизофосфатидилхолинов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: a-P<0.001; b-P<0.01; d-P>0.5

почти 100% возрастание уровня ЛФХ и уменьшение количества ФХ, согласно рис. 2, с демонстрацией предельно выраженной взаимобусловленности этих двух противоположно

направленных сдвигов. В связи с этим интерес вызывают количественные изменения ФЭ и ФС как отдельных представителей НФЛ и КФЛ, активно вовлекающихся в реакции трансформации ФХ. Так, например, в МСФГ убыль содержания ФХ сопровождается

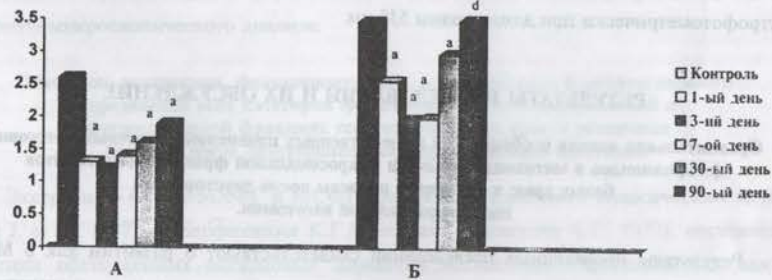


Рис. 2. Динамика количественных изменений фосфатидилхолинов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

возрастанием уровня не только ЛФХ, но и ФЭ, как это показано на рис. 3. Отмеченный сдвиг вполне логичен и может быть объяснен интенсификацией не только реакций деацилирования ФХ, но и процессов деметилирования указанных липидов с трансформацией их в ФЭ. Вместе с тем не исключено также, что определенная часть ФЭ,

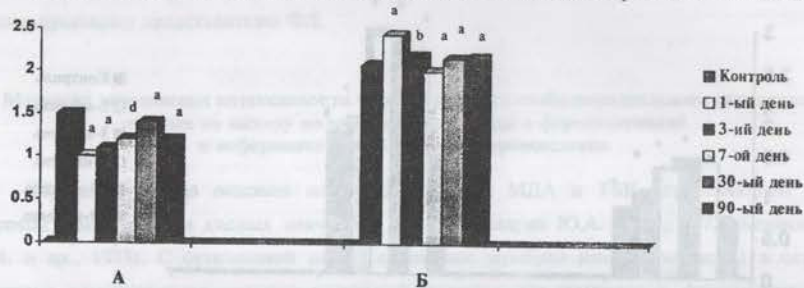


Рис. 3. Динамика количественных изменений фосфатидилэтанолламинов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

образованная из ФХ, в свою очередь, подвергается карбоксилированию в направлении биосинтеза ФС, уровень которых, согласно нашим наблюдениям, также возрастает.

Следует заметить, что аналогичная закономерность в количественных изменениях выше поименованных ФЛ прослеживается и в более поздние сроки после ваготомии. Вместе с тем, отмеченные пертурбации в количественных сдвигах ЛФХ и ФХ на 90-ый день после предпринятой операции оказываются статистически недостоверными, в отличие от продолжающегося возрастания содержания ФЭ и ФС, правда, в менее выраженном виде.

Что касается одного из ярких представителей НФЛ - СФМ, то, согласно имеющейся научной информации (Дятловицкая Э.В. 1998; Дятловицкая Э.В. и др., 1998), этим липидам в последнее время придается особое значение в обеспечении биоэффекторной роли на уровне различных образований. В связи с этим представляло существенный интерес выяснение особенностей регуляторных воздействий билатеральной поддиафрагмальной ваготомии на количественные изменения СФМ. Как вытекает из приведенного рис. 4, выключение указанного звена ПНС во все периоды после

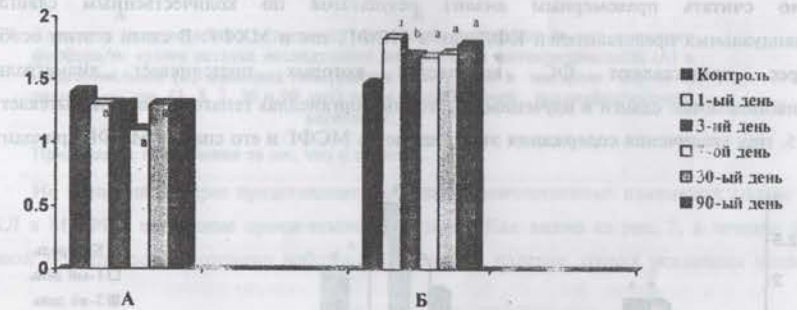


Рис. 4. Динамика количественных изменений сфингомиелинов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

моделирования ваготомии характеризуется статистически достоверным возрастанием содержания СФМ в МСФГ, что мы склонны интерпретировать как биологически оправданную и чрезвычайно важную закономерность, направленную на поддержание биорегуляторных систем клеточного аппарата на уровне исследованных органелл. Как явствует из рис. 1-4, в отличие от МСФГ, в МХФГ на фоне односторонне протекающих качественно-количественных изменений ФХ и ЛФХ, сдвиги содержания ФЭ и СФМ протекают в диаметрально противоположном направлении. Так, например, в МСФГ, как уже отмечалось, содержание ФЭ во все периоды после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии статистически достоверно возрастало, что в определенной степени подчеркивает существование взаимосвязи и взаимообусловленности между структурными и функциональными перестройками в мембранах саркоплазматического ретикула при

ПОЛ (Каган В.Е. и др., 1977). Согласно рис. 3, в МХФГ уменьшение содержания ФЭ наблюдалось сейчас же на 1-ый день после ваготомии с последующим постепенным его восстановлением не достигавшим, тем не менее, контрольного уровня к концу 90-го дня и демонстрировавшим статистически достоверное с ним расхождение. Не исключено, что в изученных условиях существования организма ФЭ, равно как и свободный этаноламин и его фосфорилированный эфир, известные свойствами физиологически активных соединений, интенсивно вовлекаются в реакции окислительного фосфорилирования и дыхательной функции МХФ (Камалян Р.Г. и др., 1981). Что касается СФМ, то не исключена миграция этих соединений в очаги наиболее выраженной демиелинизации - процесса предельно чувствительного к нестабильным ситуациям, контролируемым ЦНС и периферическими звеньями ВНС. В дополнение к развиваемой дискуссии, касающейся интерпретации с современных позиций этиологических механизмов описанных явлений, можно считать правомерным анализ результатов по количественным сдвигами индивидуальных представителей КФЛ как в МСФГ, так и МХФГ. В связи с этим особый интерес представляют ФС, количество которых претерпевает диаметрально противоположные сдвиги в изученных клеточных органеллах гепатоцитов. Как вытекает из рис. 5, пик увеличения содержания этих липидов в МСФГ и его спада в МХФГ приходится

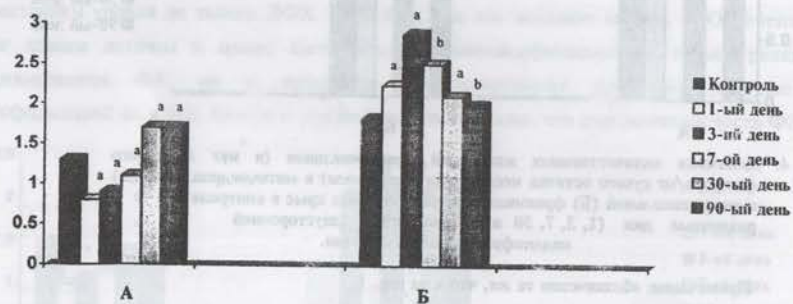


Рис. 5. Динамика количественных изменений фосфатидилсерина (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

на 1-3 дни после ваготомии, с последующей тенденцией к упорядочению, не достигая тем не менее, исходных величин, даже спустя 90 дней после ваготомии, демонстрируя при этом определенные, статистически достоверные расхождения с контролем.

Аналогичная закономерность прослеживается и в динамике количественных изменений МФИ, являющихся, как известно, метаболически наиболее стойкими представителями инозитолсодержащих ФЛ и одними из ярких представителей

фосфоинозитидного цикла. Наибольшая степень уменьшения уровня МФИ в МСФГ отраженная на рис.6, приходится на конец первой недели после ваготомии, а в МХФГ этот сдвиг проявляется, начиная с 1-го дня после ваготомии и длится без резких изменений до конца периода наблюдения, так и не достигая контрольных величин.

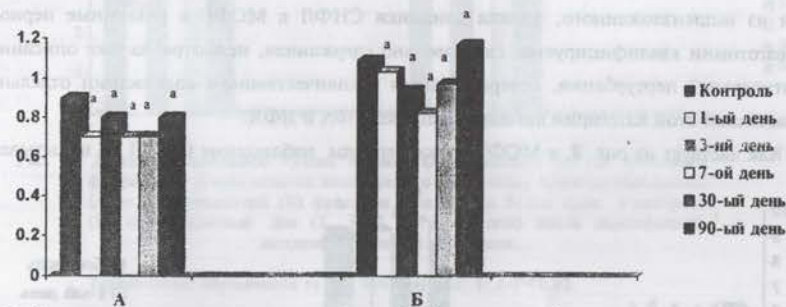


Рис. 6. Динамика количественных изменений монофосфоинозитидов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис.1.

Не меньший интерес представляет динамика количественных изменений суммы ФК и КЛ в МХФГ в изученные сроки после ваготомии. Как видно из рис. 7, в течение всей первой недели после ваготомии наблюдается стойкое падение уровня указанных липидов

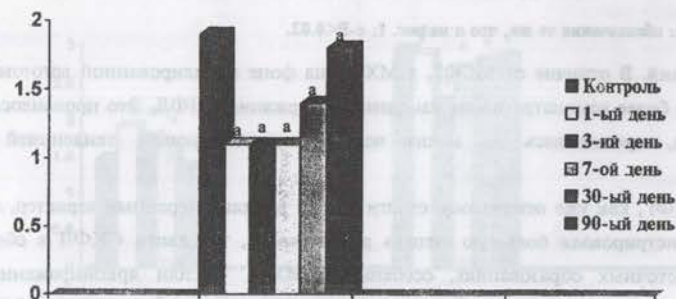


Рис. 7. Динамика количественных изменений суммы фосфатидных кислот и кардиолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной фракции гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

почти наполовину и лишь к 30-му дню, а более демонстративно к 90-му дню после ваготомии, отмечается ярко выраженная тенденция к нормализации, оставляющая отпечаток на балансе соотношений между СНФЛ и СКФЛ как факторе, определяющем стратегию функционирования систем клеточной активности (Крепс Е.М., 1967, 1981). Исходя из вышеизложенного, оценка динамики СНФЛ в МСФГ в различные периоды после ваготомии квалифицируется как довольно сдержанная, несмотря на уже описанные "драматические" пертурбации, совершающиеся в количественном содержании отдельных представителей этой категории липидов, например, ФХ и ЛФХ.

Как явствует из рис. 8, в МСФГ во все периоды наблюдения СНФЛ не испытывало

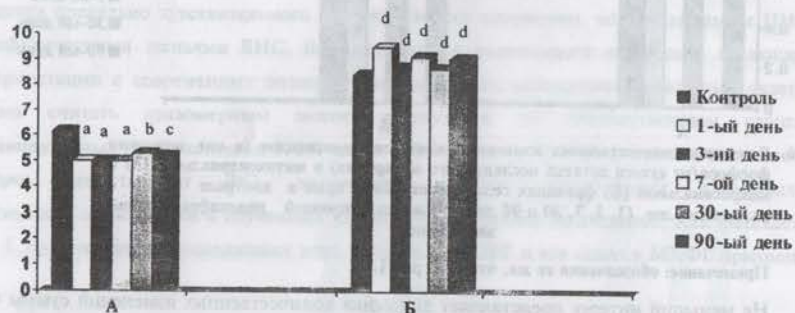


Рис. 8. Динамика изменений суммы нейтральных фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1; $c-P < 0.02$.

заметных изменений. В отличие от МСФГ, в МХФГ на фоне моделированной ваготомии было установлено более демонстративное изменение содержания СНФЛ. Это проявилось с первого же дня, продолжаясь до конца недели, с последующей тенденцией к восстановлению.

Если в МСФГ, как уже отмечалось, сдвиги СНФЛ носили умеренный характер, а в МХФГ они демонстрировали большую степень реактивности, то сдвиги СКФЛ в обеих изученных субклеточных образованиях, особенно в МХФГ носили ярко выраженный диаметрально противоположно направленный характер: в сторону увеличения в МСФГ и, наоборот, - уменьшения в МХФГ.

Согласно рис. 9, и в том, и в другом случае к 90-му дню после ваготомии наблюдавшееся расхождение в изученных показателях стиралось до уровня статистически недостоверных различий по сравнению с контролем.

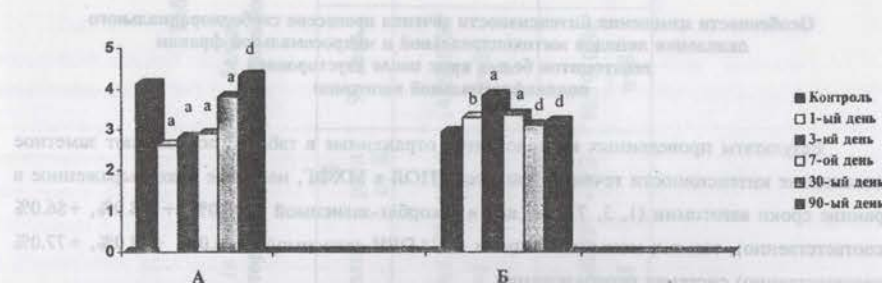


Рис. 9. Динамика изменений суммы кислых фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1; $c-P < 0.02$.

С отмеченной точки зрения в условиях ваготомии, интерес представляют изменения в величине К СНФЛ/СКФЛ, отраженные на рис. 10.

Колебания этого показателя во все периоды наблюдения оказались очевидными, а расхождения его от контрольных величин статистически достоверными. По-видимому, для его окончательного упорядочения потребуются более длительные наблюдения, которые станут предметом наших дальнейших специальных исследований, благодаря которым и выявятся реальные сроки репарационных процессов, необходимые для компенсации утраченных функций ВНС.

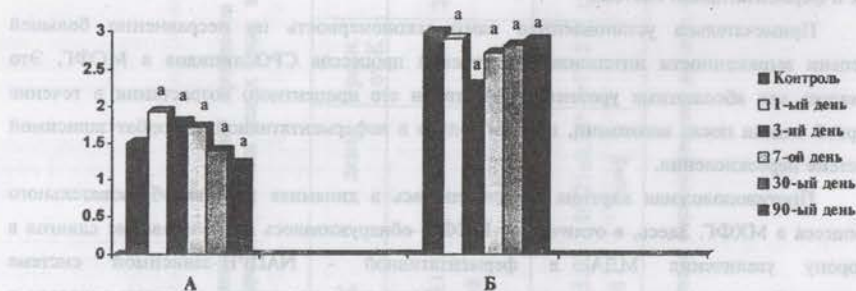


Рис. 10. Динамика изменений коэффициента отношения суммы нейтральных фосфолипидов к сумме кислых фосфолипидов (в мкг липидного фосфора/мг сухого остатка исследуемого материала) в митохондриальной (А) и микросомальной (Б) фракциях гепатоцитов белых крыс в контроле (К) и в различные дни (1, 3, 7, 30 и 90 дни) после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии.

Примечание: обозначения те же, что и на рис. 1.

Особенности изменения интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов митохондриальной и микросомальной фракции гепатоцитов белых крыс после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии

Результаты проведенных исследований, отраженные в табл. 1, показывают заметное повышение интенсивности течения процессов ПОЛ в МХФГ, наиболее ярко выраженное в ранние сроки ваготомии (1, 3, 7 дни) как в аскорбат-зависимой (+86.0%, +124.0%, +86.0% соответственно), так и в меньшей степени в NADPH-зависимой (+79.0%, +88.0%, +77.0% соответственно) системах перекисления.

В более поздние сроки после ваготомии (спустя 30, 90 дней) наблюдается относительное коррелирование величин изучаемых показателей, хотя в неферментативной системе содержание липидных перекисей продолжает оставаться на высоких уровнях по сравнению с таковым в контрольных опытах (+53.0%, +32.0% соответственно).

Как видно из табл. 2, аналогичная закономерность в течении процессов СРО липидов прослеживается и в МСФГ в нестранным более демонстративной форме. Она проявляется в виде ярко выраженного повышения интенсивности течения процесса перекисобразования в ранние сроки после ваготомии особенно в аскорбат-зависимой (+174.0%, +168.0%, 144.0% соответственно) системе, нежели в в NADPH-зависимой (+76.0%, +73.0%, +57.0% соответственно) системе перекисления липидов. Этого нельзя сказать относительно более поздних сроков (30 и 90 дни) наблюдения.

На 30 и 90 дни после ваготомии и в МХФГ, и в МСФГ отмечается полнейшая нормализация интенсивности течения процессов СРО липидов как в неферментативной, так и ферментативной системе.

Примечательна установленная нами закономерность по несравненно большей степени выраженности интенсивности течения процессов СРО липидов в МСФГ. Это касалось как абсолютных уровней МДА, так и его процентного возрастания в течение первой недели после ваготомии, причем только в неферментативной, аскорбат-зависимой системе перекисления.

Противоположная картина прослеживалась в динамике перекисобразовательного процесса в МХФГ. Здесь, в отличие от МСФГ, обнаруживалось доминирование сдвигов в сторону увеличения МДА в ферментативной - NADPH-зависимой системе перекисобразовательного процесса, хотя и абсолютные уровни его уступали таковым в соответствующей реакции МСФГ. Элемент биологической сопряженности описанных явлений очевиден и нуждается в проведении дальнейших специальных исследований для выявления природы установленных феноменов на клеточном, субклеточном, мембранном и организменном уровнях.

Таблица 1.

Показатели	К	Изменение интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов (в нМ МДА/мг белка) в митохондриальной фракции печени белых крыс в контроле (К) и в различные дни после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии (n=102).								
		1 день	3 день	7 день	30 день	90 день	% разн. от К	% разн. от К	% разн. от К	% разн. от К
Аскорбат-зависимое перекисление	10.81±1.12 n=8	20.15±0.67* n=8	24.23±1.19* n=10	20.08±0.57 ^d n=10	+85.8	16.59±1.12 ^d n=8	+53.5	14.29±0.36 ^d n=8	+32.2	
NADPH-зависимое перекисление	9.08±1.02 n=8	16.21±0.38* n=8	17.10±0.37* n=10	+88.3	+77.4	9.06±0.43 ^d n=8	-0.2	10.79±0.98 ^d n=8	+18.8	

Примечание: показатели достоверности те же, что и на рис. 1.

Таблица 2.

Изменение интенсивности течения процессов спонтаннорадикального окисления липидов (в нМ МДА/мг белка) в микросомальной фракции печени белых крыс в контроле (К) и в различные дни после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии (n=87).

Показатели	К	1 день	% разн. от К	3 день	% разн. от К	7 день	% разн. от К	30 день	% разн. от К	90 день	% разн. от К
Аскорбат-зависимое перекисление	16.29±1.5 n=7	44.59±3.17 ^a n=8	+174.0	43.58±1.12 ^a n=7	+168.0	39.71±1.88 ^a n=7	+144.0	20.68±1.45 ^a n=8	+27	20.21±1.90 ^b n=7	+24.0
NADPH-зависимое перекисление	15.41±2.3 n=7	27.16±0.58 ^a n=7	+76.0	26.63±19.2 ^a n=7	+73.0	24.13±2.60 ^a n=8	+57.0	15.95±1.03 ^d n=7	+3.5	16.25±1.58 ^d n=7	+5.5

Примечание: показатели достоверности те же, что и на рис. 1.

Таким образом, можно заключить, что после двусторонней поддиафрагмальной ваготомии в течении первой недели происходит заметная интенсификация СРО НЭЖК ФЛ как в МХФГ, так и особенно в МСФГ в сочетании с высоким содержанием в них ЛФХ, обладающих, как известно, мембранотоксическими и мембранолитическими свойствами, обнаруживаемыми при различных формах токсических поражений живых систем (Карагезян К.Г., 1972; Енгибарян А.А. и др., 1994; Бадалян А.Г., 1995; Карагезян М.К., 1997), нуждающихся в специальной медикаментозной коррекции (Карагезян К.Г. и др., 1996а,б,в,г; 1997; Гимоян Л.Г., 1998), наподобие, в частности, антиоксиданто- и протеинотерапии (Григорян В.А., 1998; Мартиросян А.А., 1998). Следовательно, не вызывает сомнений очевидность выраженного ингибирующего действия продуктов перекисления липидов на активность мембраносвязанных, липидзависимых ферментных систем (Бурлакова Е.Б. и др., 1982а,б), что чревато расстройствами в функциональной активности и структурной организации изученных нами важнейших субклеточных элементов. Более того, они вписываются в тончайшие механизмы этио-патогенеза многочисленных болезненных состояний, сопрягающихся с "драматическими", по существу, пертурбациями, приводящими к нарушениям адаптационно-приспособительных возможностей гепатоцитов и организма в целом, представляющих общебиологический интерес (Шакарян М.А., 1998; Овакимян С.С., 1998; Оганесян А.А., 1998).

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Двусторонняя поддиафрагмальная ваготомия у белых крыс сопровождается ярко выраженными расстройствами в митохондриальной и микросомальной фракциях гепатоцитов качественного состава и количественного содержания фосфолипидов всех категорий.
2. Отмеченные нарушения в исследованных органеллах оказываются наиболее демонстративными в 1, 3, 7 дни после ваготомии; в подавляющем большинстве случаев они оказываются противоположно направленным при сопоставлении полученных результатов по каждой из изученных фракций в отдельности.
3. В более поздние сроки после ваготомии - 30 и 90 дни эти нарушения носят более умеренный характер с тенденцией к нормализации.
4. Моделированное нами выключение парасимпатического звена вегетативной нервной системы характеризуется повышением в исследованных органеллах гепатоцитов активности фосфолипазы А₂, проявившимся в виде двукратной убили в них фосфатидилхолинов и адекватного возрастания уровня лизо-фосфатидилхолинов.
5. Количественные изменения индивидуальных фракций фосфолипидов в исследованных субклеточных образованиях гепатоцитов в условиях ваготомии приводят к дисбалансу между суммами нейтральных и кислых фосфолипидов с увеличением в митохондриальной фракции коэффициента отношения первых ко

вторым в течение первой недели наблюдения и, наоборот, уменьшением его в микросомальной фракции на всем протяжении постваготомического периода.

6. Продолжающееся, спустя 90 дней после ваготомии, статистически достоверное расхождение величин изученных коэффициентов по сравнению с контролем свидетельствует о незавершенности процесса восстановления утраченных в результате предпринятого оперативного вмешательства структурно-функциональных и метаболических свойств гепатоцитов, требующего более длительного периода реконвалесценции.

7. Двусторонняя поддиафрагмальная ваготомия, сопровождающаяся деацилированием фосфолипидов-глицеридов, катализируемым фосфолипазой А₂, характеризуется выходом высоких концентраций незэтерифицированных жирных кислот моно- и полиенового ряда, интенсивно вовлекающихся в реакции свободнорадикального перекисления как в ферментативной, так и особенно в неферментативной системе перекиссообразования.

8. Повышенный уровень образования липидных перекисей в изученных субцеллюлярных образованиях гепатоцитов спустя 90 дней с момента ваготомии нормализуется и не демонстрирует статистически достоверных расхождений по сравнению с контрольными показателями.

9. Полученные результаты свидетельствуют о длительности репаративного процесса в печени при ваготомии, необходимости поиска эффективных мер по сокращению сроков реконвалесценции структурно-функциональной организации и метаболической активности этого органа, что станет объективным подтверждением терапевтической эффективности различных форм ваготомий и их перспективности в лечении различных гастро-энтерологических заболеваний, в частности язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВНС	-	вегетативная нервная система
ПНС	-	парасимпатическая нервная система
ДПК	-	двенадцатиперстная кишка
ЯБЖ	-	язвенная болезнь желудка
ЯБДПК	-	язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки
ТБК	-	тиобарбитуровая кислота
ФЛ	-	фосфолипиды
НФЛ	-	нейтральные фосфолипиды
КФЛ	-	кислые фосфолипиды
СНФЛ	-	сумма нейтральных фосфолипидов
СКФЛ	-	сумма кислых фосфолипидов
СФЛ	-	сумма всех фосфолипидов
ФХ	-	фосфатидилхолины
ФЭ	-	фосфатидилэтанолamines
СФМ	-	сфингомиелины
ЛФХ	-	лизофосфатидилхолины
ФС	-	фосфатидилсерины
МФИ	-	монофосфоинозитиды
ФК+КЛ	-	сумма фосфатидных кислот и кардиолипидов
ДФЛ	-	дифосфоинозитиды
ТФИ	-	трифосфоинозитиды
МХФ	-	митохондриальная фракция

МХФ	-	митохондриальная фракция гепатоцитов
МСФГ	-	микросомальная фракция гепатоцитов
ФЛазА ₂	-	фосфолипаза А ₂
СРО	-	свободнорадикальное окисление
ПОЛ	-	перекисное окисление липидов
НЭЖК	-	незэтерифицированные жирные кислоты
ЖК	-	жирные кислоты
МДА	-	малоновый диальдегид

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Elbakyan G.V., Hoveyan G.A., Danielyan R.K., Kosyan F.F., Ghazinyan A.A., Sekoyan E.S., Karageuzyan K.G., Sekoyan I.E. The role of symptho-adrenal system in regulation of phospholipid-chromatin interrelations in brain and myocardial tissues // 15th Meeting of the ISN, Kyoto, Japan. Neurochemistry. - 1995. -V.65, No A, Abstr. No A-S195.
2. Melkonian M.M., Simonyan M.A., Kocharyan K.M., Kazarian Sh.H., Badalyan M.A., Ghazinyan A.A., Grigoryan V.A., Martirosian A.H., Karageuzyan M.K. First Conference of the Armenian International Brain Research Organization (IBRO) Assotiation // Abstracts and oral presentation. Yerevan. - 1996. -P.35.
3. Мелконян М.М., Карапетян С.А., Бадалян М.А., Казарян А.А., Григорян В.А. Изменения энергетического обмена в головном мозге белых крыс при различных стрессовых состояниях // Медико-биологические проблемы стресса. Iая Республиканская конференция. Ереван. - 1997. -С.88.
4. Казарян А.А., Карагезян К.Г., Казарян Ш.А. Механизмы возникновения оксидативного стресса на фоне двусторонней поддиафрагмальной ваготомии // Медико-биологические проблемы стресса. Iая Республиканская конференция. Ереван. - 1997. -С.98.
5. Мелконян М.М., Симонян М.А., Казарян А.А., Мартиросян А.Г., Григорян В.А. Изменения липопротеинов крови белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии // Материалы 70-ой научной конференции ЕрГМУ им. М.Гераци. Ереван. - 1997. - С.24.
6. Казарян А.А. Изменения фосфолипидов митохондриальной фракции печени белых крыс при двусторонней поддиафрагмальной ваготомии // Ежегодник Академии хирургических наук. Ереван. - 1998. -Т.2. -С.43-44.
7. Казарян А.А. Особенности изменений фосфолипидов митохондриальной фракции печени белых крыс при двусторонней поддиафрагмальной ваготомии // Докл. НАН РА. - 1999. -Т.99, No 1. -С.87-92.
8. Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Амирханян Л.Т., Джанполадян Е.Г., Овсепян Г.А., Ованян К.О., Погосян А.Ю., Данилова Л.Л., Ордян В.В., Казарян А.А. Состояние систем про- и антиоксидантного действия в формировании молекулярных механизмов патогенеза различных болезненных состояний организма, их диагностировании и прогнозировании в клинике и эксперименте // Диагностическая медицина. Международный симпозиум. Ереван. - 1999. -С.100.
9. Карагезян К.Г., Овсепян Л.М., Овакимян С.С., Карабашян Л.В., Карагезян М.К., Бадалян М.А., Овсепян Л.М., Овакимян С.С. Особенности изменения интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления липидов митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов в различные сроки после ваготомии // Докл. НАН РА. - 1999. -Т.99, No 3. -С.61-65.

Ղազիմյան Աննա Արշալույսի

ՍՊԻՏԱԿ ԱՈՆԵՏՆԵՐԻ ՀԵՊԱՏՈՑԻՏՆԵՐԻ
ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ԳՈՅԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻՂ-
ՖՈՍՖՈԼԻՊԻՂԱՅԻՆ ՓՈԽՂԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ՎԱԳՈՏՈՄԻԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա Մ Փ Ո Փ ՈՒ Մ

Երկկողմանի ենթաստոծանիական վագոտոմիայից հետո սպիտակ առնետների հեպատոցիտների միտոքոնդրիալ և միկրոսոմալ ֆրակցիաներում նկատվում է ֆոսֆոլիպիդների որակական կազմի և քանակական բաղադրության խիստ արտահայտված խանգարումներ, որոնք հիմնականում պայմանավորված են հավանաբար ֆոսֆոլիպազա Ա₂ ակտիվության զգալի բարձացմամբ: Որպես ապացույց կարող են հանդիսանալ մեր կողմից արձանագրված լիզոֆոսֆատիդիլսոլինների, ֆոսֆատիդիլսոլինների, ֆոսֆատիդիլսերինների, ֆոսֆատիդիլթրանոլամինների և մի շարք ուրիշ ոչ պակաս նշանակություն ունեցող ֆոսֆոլիպիդների պարունակության կտրուկ տեղաշարժեր, որոնք վկայում են այդ կարևոր ենթաբջջային գոյացությունների կառուցվածքային կազմակերպման և ֆունկցիոնալ ակտիվության խանգարումների մասին: Նշված տեղաշարժերը տեղիք են տալիս լուրջ մտորումների առձանագրված փաստերի նշանակությանը միշտ մեկնաբանություն տալու վերաբերյալ: Դա առավել ևս կարևոր է, քանի որ, համաձայն մեր կողմից ստացված փորձարարական տվյալներով հաստատված է, որ վերը նշված ֆոսֆոլիպիդային փոխանակության խանգարումները միաժամանակ զուգորդվում են նաև ազատ ռադիկալային պրոցեսների ակտիվացմամբ և լիպիդային գերօքսիդների զգալի քանակությունների առաջացմամբ: Վերջիններս, ինչպես հայտնի է օժտված են վառ արտահայտված թաղանթառոքսիկ և թաղանթալիտիկ հատկություններով մի բան, որ բերում է տվյալ կենսաբանական համակարգի մահվան: Վերը նշվածը, վկայում է այն մասին, որ ներկայումս լայն կիրառություն գտած ստամոքսի և տասներկու մատնյա աղիի խոցային հիվանդությունների բուժման ժամանակ վագոտոմիայի լայնածավալ օգտագործումը պետք է միաժամանակ լուրջ մտահոգություն առաջացնի վերը նշված խանգարումների շուտափույտ վերացման վերաբերյալ մեթոդների հայթաթման: Ուստի համաձայն մեր կողմից ստացված փաստացի տվյալների, որպես առաջնահերթ սպայման անհրաժեշտ է ձեռնարկել ամենայն հնարավոր միջոցառումներ վագոտոմիայի հետևանքով առաջացած հեպատոցիտների կառուցվածք-ֆունկցիոնալ և մետաբոլիկ խանգարումները կարճ ժամանակաշրջանում վերացնելու և նորմալ ֆիզիոլոգիական վիճակներին վերադարձնելու: Կատարած հետազոտությունները ցույց են տալիս վեգետատիվ նյարդային համակարգի պարասիմպաթիկ հատվածի տրոֆիկա-ադապտացիոն ազդեցությունը ենթաբջջային գոյացությունների և ամբողջական բջիջների վրա, ինչպես նաև մարսողական տրակտի տարբեր օրգանների գործունեության հսկողության անհրաժեշտությունը ցողունային և ընտրողական վագոտոմիայի պայմաններում:

Handwritten signature

