

УДК 577.352.465: 616.12
© Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА

С.А. Афанасьев, Т.Ю. Реброва, Д.С. Кондратьева*

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт кардиологии
Томского научного центра СО РАМН, 634012, Томск, ул. Киевская 111а;
эл. почта: Rebrova@cardio.tsu.ru

На крысах линии Wistar изучено изменение фосфолипидного спектра мембран эритроцитов при моделировании постинфарктного кардиосклероза. Показано, что в мембранах эритроцитов животных с кардиосклерозом, сформировавшимся после экспериментальной коронароокклюзии, достоверно снижается уровень минорного фосфолипида - фосфатидилинозитола более чем на 40% и увеличивается на 20% содержание мажорного фосфолипида – фосфатидилэтаноламина. При этом в сыворотке крови животных отмечено высокое содержание продуктов перекисного окисления липидов - малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, сочетающееся со значительным снижением активности антиокислительных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы.

Сделан вывод о том, что формирование постинфарктного кардиосклероза сопровождается усилением свободнорадикальных реакций, что приводит к изменению фосфолипидного состава клеточных мембран и снижению компенсаторных возможностей системы ферментативных антиоксидантов. Указанные изменения формируют метаболический фон, способный влиять на процесс ремоделирования сердца.

Ключевые слова: фосфолипиды, перекисное окисление липидов, экспериментальный постинфарктный кардиосклероз.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что свободнорадикальное окисление липидов вносит весомый вклад в патогенез ишемического и реперфузионного повреждения миокарда [1]. Интенсификация процессов перекисидации липидов сопровождается значительным изменением состава и степени окисленности мембранных фосфолипидов [1, 2], что в конечном итоге приводит к нарушению целостности липидного бислоя клеточных мембран и снижению активности фосфолипидзависимых энзиматических систем. В условиях активного протекания свободнорадикальных процессов наиболее резко уменьшается количество фосфолипидов (ФЛ), содержащих в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты – фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин [2]. Избирательная делипидизация мембран вызывает рост отношения холестерол/ФЛ, изменение физико-химических свойств мембран, увеличение их микровязкости. При инфаркте миокарда подобные изменения в мембранах кардиомиоцитов приводят к нарушению их функциональной активности и в крайнем своем проявлении вызывают некроз клеток сердечной мышцы. Для коррекции подобных изменений при тромболизисной терапии

* - адресат для переписки

инфаркта миокарда, а также при проведении операций аортокоронарного шунтирования используют препараты, оказывающие цитопротекторное и антиоксидантное действие [3, 4]. В постинфарктном периоде перекисное поражение клеточных мембран не ограничивается только зоной некроза, а оказывает негативное влияние на непораженные участки сердца [1]. Индукция перекисного окисления липидов может происходить и в мембранах форменных элементов крови, находящихся в тесном контакте с пораженным участком миокарда [5]. Изменения в биомембранах эритроцитов ведут к снижению деформируемости клеток, гемолизу эритроцитов, ухудшению кислородтранспортной функции [2]. Возможно, что такое влияние сохраняется на протяжении длительного времени и может стать патогенетически значимым фактором постинфарктного ремоделирования миокарда, приводящего к развитию сердечной недостаточности и нарушению сердечного ритма.

Целью настоящего исследования явилось изучение фосфолипидного состава мембран эритроцитов крыс и интенсивности процессов перекисного окисления липидов при формировании экспериментального постинфарктного кардиосклероза.

МЕТОДИКА. Исследования выполнены на 20 крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. У животных опытной группы моделировали инфаркт миокарда, с этой целью им под эфирным наркозом перевязывали левую переднюю нисходящую коронарную артерию [6]. Животным контрольной группы выполняли ложную операцию без коронароокклюзии. Через 6 недель животных забивали путем декапитации, при этом проводили забор крови в пробирку с гепарином в соотношении 1:10. Для получения мембран эритроцитов проводили гемолиз стабилизированной гепарином крови дистиллированной водой с последующим центрифугированием при 7300 g в течении 15 мин. Полученный осадок мембран трехкратно отмывали 0,9% раствором хлористого натрия и центрифугировали в аналогичных условиях. Фосфолипиды из мембран эритроцитов выделяли по модифицированному методу Фолча [7], для этого к 0,2 мл полученных мембран добавляли 4,5 мл смеси хлороформ : метанол (2:1). Экстракт первоначально фильтровали через бумажный фильтр. С целью очищения от нелипидных примесей в каждую пробу добавляли 1/5 часть объема 50 мМ CaCl₂. Для разделения фаз, пробы центрифугировали 15 мин при 1000 g, затем верхнюю фазу декантировали, а нижнюю количественно переносили в грушевидную колбу для дальнейшего упаривания на роторном испарителе. Полученный экстракт растворяли в 0,1 мл смеси хлороформ: метанол (1:1) и использовали для дальнейших определений. Разделение фосфолипидов на основные классы проводили методом тонкослойной хроматографии [7] в слое силикагеля на пластинах "SORBFIL" (АО "Сорбполимер" Россия) в системе растворителей хлороформ – метанол – ледяная уксусная кислота – вода (60 : 25 : 1 : 4). Для проявления фосфолипидных фракций пластины опрыскивали 2% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты [8]. Сканирование пластинок осуществляли в направлении хроматографирования липидных экстрактов с последующей количественной обработкой при помощи 4.0 версии компьютерной программы "Gel-Pro Analyzer". Нами оценивалось соотношение следующих фосфолипидных фракций: сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидилэтаноламин. Идентификацию этих фракций на пластинках проводили с помощью стандартов фирмы "Sigma".

Для оценки состояния процессов перекисного окисления липидов в сыворотке крови животных спектрофотометрически определяли содержание первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов (ДК), а также одного из конечных продуктов перекисаации липидов - малонового диальдегида (МДА). Определения ДК и МДА проводили ранее опубликованными методиками [3]. О состоянии антиоксидантной системы клеток судили по активности антиокислительных ферментов каталазы [9] и супероксиддисмутазы [10]. Общий белок определяли биуретовым методом [11].

В отдельной экспериментальной группе животных, перенесших коронароокклюзию, по истечении 45 суток осуществляли гравиметрический контроль за изменением массы левого желудочка. Оценку объема повреждения миокарда производили по методу [12].

Достоверность различий полученных результатов оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента с использованием пакета программ StatGraphs (Statistika 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Через 6 недель после коронароокклюзии сердца опытных животных в сравнении с контрольными были сильно гипертрофированны и имели выраженную зону сформировавшегося рубца. Среднее значение массы сердца животных, перенесших коронароокклюзию, на $80,3 \pm 3,61\%$ ($p < 0,001$) превышало аналогичный показатель в группе ложнопериоперированных. При этом зона постинфарктного рубца составляла в среднем $11,3 \pm 0,36\%$ от массы левого желудочка. В ранее опубликованной работе мы показали, что подобное изменение сердечной мышцы после экспериментального стенозирования коронарной артерии однозначно свидетельствует о развитии кардиосклероза с характерными гистологическими и функциональными нарушениями [13].

В таблице 1 представлены результаты хроматографического анализа липидных экстрактов эритроцитарных мембран рассматриваемых групп животных. Через 6 недель после перевязки коронарной артерии животные опытной группы по составу фосфолипидных фракций эритроцитарных мембран существенно отличались от ложнопериоперированных. Так, в пробах опытной группы выявлялось достоверно уменьшение более чем на 40% содержания минорного фосфолипида – фосфатидилинозитола, и, напротив, увеличение на 20% содержания массивного фосфолипида – фосфатидилэтаноламина.

Таблица 1. Изменения фракций фосфолипидов (в %) в мембранах эритроцитов крыс в условиях экспериментального кардиосклероза.

Фосфатиды	Группы животных	
	Ложнопериоперированные животные, n = 10	Животные с постинфарктным кардиосклерозом, n = 10
Сфингомиелин	$13,84 \pm 0,36$	$14,36 \pm 0,76$ $p > 0,05$
Фосфатидилхолин	$20,78 \pm 0,46$	$21,60 \pm 1,86$ $p > 0,05$
Фосфатидилсерин	$20,56 \pm 1,02$	$18,69 \pm 1,80$ $p > 0,05$
Фосфатидилинозитол	$13,99 \pm 1,03$	$8,36 \pm 0,39$ $p < 0,01$
Фосфатидилэтаноламин	$30,83 \pm 1,07$	$36,98 \pm 3,14$ $p < 0,05$

Примечание: p – достоверность различий относительно показателей в группе интактных животных; n – количество животных в группе.

Согласно литературным данным, снижение содержания фосфатидилинозитола в структуре мембран может происходить вследствие увеличения его метаболизма в качестве предшественника вторичного мессенджера внутриклеточных процессов – диацилглицерола [14], а так же в результате

ФОСФОЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ КАРДИОСКЛЕРОЗЕ

деградации при усилении свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирных кислот, которыми богат данный фосфолипид [2]. Подобные изменения могут свидетельствовать о снижении адаптационных возможностей как целого организма, так и сердечной мышцы в частности [15]. С этих позиций выявленное нами увеличение доли легко окисляемого ненасыщенного фосфатидилэтаноламина в опытной группе животных (табл. 1) можно расценивать как результат компенсаторных процессов, происходящих в организме в постинфарктном периоде. Это предположение основывается на данных о том, что добавление в состав искусственных липидных везикул фосфатидилэтаноламина способствовало восстановлению ионтранспортирующей функции очищенной Ca^{2+} -АТФазы [16, 17]. Аналогичный эффект включения в состав мембран фосфатидилэтаноламина был отмечен и в отношении активности другого ионтранспортного фермента – Na^+, K^+ -АТФазы [16].

Как было отмечено, уменьшение процентного содержания фосфатидилинозитола может происходить в результате интенсификации перекисного окисления липидов [2]. В связи с этим мы оценили содержание продуктов перекисидации липидов и активность ферментативных антиоксидантов в сыворотке крови животных рассматриваемых групп. Результаты этих исследований представлены в таблице 2. Видно, что у животных опытной группы через шесть недель после моделирования инфаркта миокарда было отмечено повышенное по сравнению с группой ложнооперированных животных содержание МДА и ДК. Разница в значениях этих показателей между группами составила 20% и 90% соответственно. Высокое содержание ДК в сыворотке крови позволяет предположить, что увеличение активности процессов ПОЛ в зоне инфаркта миокарда запускает свободнорадикальные реакции непосредственно в липидах сыворотки и клеточных элементах крови. Определение активности каталазы и СОД в сыворотке крови животных с постинфарктным кардиосклерозом показало снижение этих показателей соответственно на 22% и 89% относительно значений в группе контроля. Полученные результаты вполне укладываются в представления о том, что состояние окислительного стресса сохраняется через 45 суток после моделирования инфаркта миокарда, поскольку увеличенное образование активных форм кислорода и перекисей липидов способствует снижению активности антиоксидантных ферментов [18].

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в сыворотке крови крыс с постинфарктным кардиосклерозом.

Показатель	Группы животных	
	Ложнооперированные животные (n=10)	Животные с постинфарктным кардиосклерозом (n=10)
Дисенные конъюгаты, $\Delta\text{E}_{232}/\text{мл}$	$1,03 \pm 0,08$	$1,96 \pm 0,09$ $p < 0,05$
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	$20,99 \pm 2,03$	$25,58 \pm 2,26$ $p < 0,05$
Каталаза, мккатал/л	$20,52 \pm 1,63$	$15,92 \pm 0,95$ $p < 0,01$
Супероксиддисмутаза, $\text{моль/мин}\cdot\text{л}$	$0,86 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$ $p < 0,01$

Примечание: p - достоверность различий относительно показателей в группе ложнооперированных животных; n – количество животных в группе.

Таким образом, на основании полученных данных можно отметить, что ремоделирование сердца в процессе формирования постинфарктного кардиосклероза сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов и изменением содержания как минорных, метаболически значимых фракций фосфолипидов (фосфатидилинозитола), так и мажорных, структурирующих мембрану (фосфатидилэтаноламина). Развитие аналогичных процессов в мембранах кардиомиоцитов, будет отражаться на функциональном состоянии клетки, ее энергетическом метаболизме и в итоге служить причиной дальнейшей дегенерации сердечной мышцы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвицкий П.Ф. (2002) Патол. физиол. экспер. тер., №2, 2-12.
2. Чернов Ю.Н., Васин М.В., Батищева Г.А. (1992) Экспер. клин. фармакол., **57**(4), 67-72.
3. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Перчаткин В.А., Максимов И.В., Марков В.А. (2004) Экспер. клин. фармакол., **67** (2), 27-30.
4. Афанасьев С.А., Вечерский Ю.Ю., Ласукова Т.В., Понамаренко И.С., Чернявский А.М. (2003) Грудная и сердечно сосудистая хирургия, №1, 66-69.
5. Фатенков В.Н., Зарубина Е.Г., Милякова М.Н. (2002) Кардиология, 6, 54.
6. Gomez A.M., Guatimosim S., Dilly K.W., Vassort G., Lederer W.J. (2001) Circulation, **104**(6), 688-693 .
7. Хиггинс Д.А. (1990) Биологические мембраны. Мир, с. 150-195.
8. Камышников В.С. (2000) Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск, Беларусь.
9. Каралюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) Лабор. дело, №1, 16-19.
10. Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. (1976) Бюлл. экспер. биол. мед., №1, 33-34.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) Справочник биохимика. М., Мир.
12. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. (1998) Am. J. Physiol., **274**, 909-914.
13. Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Фалалеева Л.П., Шахов В.П. (2005) Бюлл. экспер. биол. мед., **139**(6), 613-616.
14. Шмидта Р., Тесс Г. (1996) Физиология человека. М., Мир.
15. Сапронов Н.С., Торкунов П.А., Новоселова Н.Ю. (1997) Патол. физиол. экспер. тер., №3, 8-10.
16. Болдырев А.А., Лопина О.Д., Рубцов А.М., Свинухова И.А. (1983) Биохимия активного транспорта ионов и транспортные АТФазы. М. "Изд-во Московского университета".
17. Dalton K.A., Pilot J.D., Mall S. (1999) Biochem. J., **342**, 431-438.
18. Ланкин В.З., Вандышев Д.Б., Тихазе А.К. (1981) Докл. АН СССР, **259**, 229-231.

Поступила: 06. 02. 2007.

**PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER
CONDITIONS OF POSTMYOCARDIAL INFARCTION CARDIOSCLEROSIS**

S.A. Afanasyev, T.Y. Rebrova, D.S. Kondratieva

Research Institute for Cardiology, Tomsk Research Centre, of Russian Academy of Medical Sciences
Siberian Branch, ul. Kievskaya, 111a, Tomsk, 634012 Russia; e-mail: Rebrova@cardio.tsu.ru

Changes in phospholipid composition of the erythrocyte membranes have been studied in experimental postmyocardial infarction cardiosclerosis. Erythrocyte membranes from animals with cardiosclerosis formed after experimental occlusions of coronary arteries were characterized by significant decrease of a minor phospholipid, phosphatidylinositol (by more than 40%) and the increase of the major phospholipid, phosphatidylethanolamine. There was high content of lipid peroxidation products, malondialdehyde and conjugated dienes and the decrease in the activity of antioxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase in blood serum of these animals.

We have concluded the formation of postmyocardial infarction cardiosclerosis is accompanied by the increase of free radical reactions. This causes changes in phospholipid composition of cell membranes and the decrease of compensatory capacities of the enzymatic antioxidant system. These changes form a metabolic background, which can influence cardiac remodelling properties.

Key words: phospholipids, lipid peroxidation, experimental postmyocardial infarction cardiosclerosis.