

7. Motavkin P.A. Introduction to neurobiology. – Vladivostok: Medicine of the Far East, 2003. – 252 p.
8. Pavlovskaya E.V., Surkov A.G., Shilina N.M., et al. Modern approaches to diet therapy in obese children // Problems of pediatric nutrition. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 41-46.
9. Polyasny V.A. Application of NMDA-induced convulsions in rats in conditions of use of the ketogenic diet // Far Eastern Medical Journal. – 2012. – № 4. – P. 96-99.
10. Ryzhavsky B.Ya. Development of the brain: remote consequences of exposure to uncomfortable conditions. – Khabarovsk: FESMU Publishing House, 2009. – 278 p.
11. Sorvacheva T.N., Pyryeva E.A., Usacheva E.L. Alternative nutritional approaches in pediatric neuropsychiatric practice // Problems of pediatric nutrition. – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 45-50.
12. Tinkov A.A., Gatiulina E.R., Popova E.V., et al. Influence of adipogenic diet at an early age on the content of trace elements in tissues of rats // Path. physiology. and exp. therapy. – 2016. – Vol. 60, № 4. – P. 79-85.
13. Bough K.J., Rho J.M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet // Epilepsia. – 2007. – Vol. 48. – P. 43-58.
14. Gasior M., Rogavski M.A., Hartman A. L. Neuroprotective and disease-modifying effects of ketogenic diet // Behav. Pharmacol. – 2006. – Vol. 17. – P. 431-439.
15. Prins M.L. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury // J. Cereb. Biol. Flow. Metab. – 2008. – Vol. 28. – P. 1-16.

Координаты для связи с авторами: Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биологии и гистологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-13-96; Лебедево Ольга Антоновна – д-р мед. наук, директор Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-55-74, e-mail: leoaf@mail.ru; Лазинская Ольга Владимировна – аспирант кафедры биологии и гистологии ДВГМУ; Кузнецова Мария Станиславовна – аспирант Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД, тел. 8-(4212)-70-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru; Гусева Ольга Евгеньевна – канд. мед. наук, главный врач клиники, ведущий научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ ОМиД, тел. 8-(4212)-76-55-35, e-mail: o.guseva@bk.ru.



УДК 616.12-004: 612.111.6:612.67:599.323.4

Т.Ю. Реброва, С.А. Афанасьев, С.В. Попов

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ КОМПОНЕНТОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН И АКТИВНОСТЬ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КАРДИОСКЛЕРОЗА У КРЫС

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук, 634012, ул. Киевская, 111а, тел. 8-(3822)-55-50-57, г. Томск

Резюме

В мембранах эритроцитов крыс возрастом 4 месяца (n=20), 12 месяцев (n=20) и 24 месяца (n=20) исследовали активность Na^+/K^+ -АТФазы, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ). Каждая возрастная группа включала по 10 интактных животных и животных с постинфарктным кардиосклерозом (ПИКС). Обнаружено зависящее от возраста снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы тений эритроцитов животных 12 и 24 месяцев. У интактных 12 мес. животных было отмечено снижение содержания вторичных продуктов ПОЛ и их увеличение в группе 24 мес. животных относительно 4 мес. Показатели ПОБ у интактных животных с возрастом не изменялись. Развитие ПИКС у 4 месячных животных сопровождалось повышением накопления продуктов окислительной модификации белков и липидов, и снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы. Для 12 месячных животных с ПИКС было характерно менее выраженное снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы, увеличение накопления продуктов ПОБ, при неизменном содержании вторичных продуктов ПОЛ относительно интактного возрастного контроля. У старых животных возрастом 24 месяца формирование ПИКС сопровождалось снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы и достоверно значимым увеличением содержания вторичных продуктов ПОЛ. При этом интенсивность образования продуктов ПОБ оставалась на уровне интактных животных этого возраста.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, карбонильная модификация белков, Na^+/K^+ -АТФаза, постинфарктный кардиосклероз, возраст.

AGE PECULIARITIES OF OXIDATION MODIFICATION OF ERYTHROCYTES MEMBRANE AND ACTIVITY OF Na^+/K^+ -ATPHASE IN ARTEROSCLEROSIS DEVELOPMENT IN RATS

Research Institute of cardiology, Tomsk National Research Center of the Russian academy of sciences, Tomsk

Summary

The authors studied activity of Na^+/K^+ -ATPase, content of peroxide oxidation of lipid (POL) and proteins (POP) in erythrocytes' membranes in 4 month old rats. Each age group included 10 intact animals and the animals with post infarction cardiosclerosis (PICS). The authors revealed age dependent decrease in activity of Na^+/K^+ -ATPase of erythrocytes in 12 and 24 month old animals. The intact 12 month old rats had decrease of secondary POL products and their increase in 24 month old animals compared to 4 month old animals. POP indexes in intact animals did not change with age. PICS development in 4 month old animals was accompanied by increased accumulation of Na^+/K^+ -ATPase, products of oxidation modification of proteins and lipids and activity decrease of Na^+/K^+ -ATPase. 12 month old animals with PICS had a less significant decrease of Na^+/K^+ -ATPase activity, increased accumulation of POP products with an unchanged content of the secondary POL products compared to the control group. In old, 24 month old animals PICS development was accompanied by decrease in Na^+/K^+ -ATPase activity and a reliable increase in POL secondary products. At the same time, intensity of POP products remained at the level of intact animals of the same age.

Key words: lipids peroxide oxydation, proteins carbonile modification, Na^+/K^+ -ATPase, post infarction cardiosclerosis, age.

Хорошо известно, что барьерная функция является одной из основных для клеточной мембраны. Благодаря ей, клетка сохраняет самоидентичность, способность функционировать и взаимодействовать с микро-окружением. Клеточная мембрана имеет сложную структуру. Наряду с липидным бислоем, она включает и значительный белковый компонент, который формирует рецепторы и ион-транспортирующие каналы мембран. Каналы обеспечивают избирательный перенос ионов и поддержание ионного гомеостаза. В частности натриевый насос (молекулярной формой которого является Na^+/K^+ -АТФаза) контролирует объём клетки, теплообмен, мембранный потенциал, pH клеточной среды и даже концентрацию свободного Ca^{2+} [1].

Показано, что химический состав клеточной мембраны меняется под воздействием перекисного окисления. Считается, что перекисное окисление является одним из важных компонентов процесса старения и

повреждения клетки при ишемическом и реперфузионном воздействии [5]. Ранее нами было показано, что перекисное окисление является значимым компонентом постинфарктного ремоделирования миокарда [2, 3]. Изменение состава клеточной мембраны принято рассматривать как этап предшествующий изменению работы систем ионного транспорта, сопряженных с клеточной мембраной, провоцирующий электрическое ремоделирование кардиомиоцитов и миокарда в целом. Однако прямых исследований возраст-зависимых изменений ион-транспортирующих структур мембран и их сопряженности с перекисным окислением в процессе формирования патологий сердца крайне мало.

Цель работы – исследовать активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов крыс разного возраста с постинфарктным кардиосклерозом и её сопряженность с содержанием продуктов перекисного окисления липидов и белков

Материалы и методы

Экспериментальные работы проводились в соответствии с Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Работа выполнена на 60 крысах-самцах линии Вистар трех возрастных групп. Первая возрастная группа представлена животными 4-месячного возраста, массой 200-250 г. Вторую и третью группу составили крысы возрастом 12 (массой тела 400-450 г) и 24 месяца (массой 500-550 г), соответственно. В каждой группе было 10 интактных и 10 опытных животных.

Опытным животным всех групп моделировали инфаркт миокарда методом коронароокклюзии [2]. В течение последующих 42 суток, у них формировался постинфарктный кардиосклероз (ПИКС). По истечении этого срока животных выводили из эксперимента и проводили забор биологических образцов. Кровь забирали в пробирку с гепарином в соотношении 1:10.

Тени эритроцитов получали в результате гипоосмотического гемолиза клеток по описанной ранее методике [4]. Белок определяли микробиуретовым методом [7].

Выраженность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов оценивали в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), измеряя концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) при $\lambda=535$ нм [2]. Определение окислительной модификации аминокислотных остатков белков мембран эритроцитов проводили в реакции взаимодействия образовавшихся карбонильных производных с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) [6] с максимумом поглощения при $\lambda=370$ нм.

Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Статистически значимыми считали различия при значении $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты определения активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов животных рассматриваемых возрастных групп. У

животных возрастом 12 и 24 месяца уже в интактном состоянии значения активности этого фермента оказались статистически значимо ниже, чем в группе ин-

тактных молодых животных (1-я возрастная группа).

При оценке активности Na^+/K^+ -АТФазы у интактных животных и животных с ПИКС в пределах одной возрастной подгруппы оказалось, что формирование ПИКС у крыс 1 группы сопровождалось снижением активности этого фермента. Различие между полученными величинами составило 2,5 раза и было статистически значимо ($p < 0,05$). У крыс старших возрастных групп, влияние рассматриваемой патологии оказалось аналогичным. Согласно представленным в таблице данным, у 12- и 24-месячных животных (2-я и 3-я возрастные группы), показатели активности Na^+/K^+ -АТФазы при ПИКС снижались в 1,5 и 1,6 раза, соответственно, относительно интактных значений в своих возрастных группах. При этом оказалось, что абсолютные значения, до которых снижается активность Na^+/K^+ -АТФазы при ПИКС в группах животных разного возраста были практически одинаковы (таблица).

Таблица

Результаты исследования активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов крыс разного возраста в интактном состоянии и с постинфарктным кардиосклерозом ($M \pm SD$)

Группы животных		Na^+/K^+ -АТФаза, $\mu\text{моль P}_i/\text{час} \cdot \text{мг белка}$
Животные возрастом 4 месяца	Интактные крысы, (n=10)	$0,036 \pm 0,013$
	Крысы с ПИКС (n=10)	$0,014 \pm 0,004$ ($p_1 < 0,05$)
Животные возрастом 12 месяцев	Интактные крысы (n=10)	$0,021 \pm 0,003$ ($p_2 < 0,05$)
	Крысы с ПИКС (n=10)	$0,014 \pm 0,007$ ($p_1 < 0,05$)
Животные возрастом 24 месяцев	Интактные крысы (n=10)	$0,019 \pm 0,005$ ($p_2 < 0,05$)
	Крысы с ПИКС (n=10)	$0,012 \pm 0,003$ ($p_1 < 0,05$)

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными животными в возрастной подгруппе; p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в группе 4-месячных животных; n – количество животных в группе.

Одним из основных процессов, оказывающим регуляторное влияние на структурное и функциональное состояние мембран клеток, является перекисное окисление белковых и липидных молекул. На рисунке 1 представлены результаты определения ТБК-АП в мембранах эритроцитов животных разного возраста. Видно, что наименьшее значение этого показателя – 6,23 $\mu\text{моль}/\text{мг}$ белка было отмечено у 12-месячных интактных животных ($p_{4\text{мес}-12\text{мес}} = 0,014$; $p_{12\text{мес}-24\text{мес}} = 0,003$). У животных 3-й возрастной группы (24-месячных) содержание ТБК-АП (17,17 $\mu\text{моль}/\text{мг}$ белка) оказалось напротив самым высоким. Его величина значимо ($p_{4\text{мес}-24\text{мес}} = 0,013$; $p_{12\text{мес}-24\text{мес}} = 0,003$) превышала уровень не только 2-й, но и 1-й возрастной группы.

Согласно данным, представленным на рисунке 1, развитие ПИКС не повлияло на соотношение содержания ТБК-АП в мембранах эритроцитов животных рассматриваемых возрастных групп. Однако, внутри каждой возрастной группы реакция на ПИКС была различной. Так, у животных 1-й и 3-й групп на фоне ПИКС произошло значимое увеличение содержания ТБК-АП в 1,7 раза ($p = 0,002$) и 1,6 раза ($p = 0,0006$) соответственно. Во 2-й группе, напротив, развитие ПИКС практически не повлияло на этот показатель. Получен-

ные результаты свидетельствуют о том, что интенсивность процессов перекисного окисления липидов на разных этапах онтогенеза животных носит возраст-зависимый характер. Причем, развитие патологических процессов и в частности ПИКС могут влиять на его интенсивность.

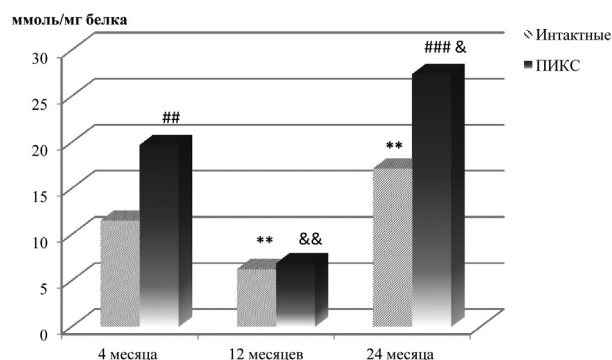


Рис. 1. Содержание ТБК-АП (ммоль/мг белка) в образцах мембран эритроцитов крыс возрастом 4, 12 и 24 месяца в норме и в условиях постинфарктного кардиосклероза

Примечание. ** – уровень статистической значимости различий у интактных животных разных возрастных групп, $p < 0,01$; ## – уровень статистической значимости различий у интактных животных и животных с ПИКС одного возраста, $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$; & – уровень статистической значимости различий показателя у животных с ПИКС между группами возрастом 4 мес. и 12 мес., 24 мес., $p < 0,05$, && – $p < 0,001$.

На рисунке 2 представлены результаты определения в мембранах эритроцитов содержания продуктов карбонильного окисления белков. Видно, что в мембранах эритроцитов интактных животных рассматриваемых возрастных групп этот показатель не имеет значимых возраст-зависимых различий и колеблется от 4,45 до 3,89 $\mu\text{моль}/\text{мг}$ белка. Стабильность рассматриваемого показателя свидетельствуют в пользу того, что в процессе онтогенеза животных белки эритроцитарных мембран подвергаются менее выраженной окислительной модификации, чем это было отмечено при исследовании интенсивности ПОЛ.

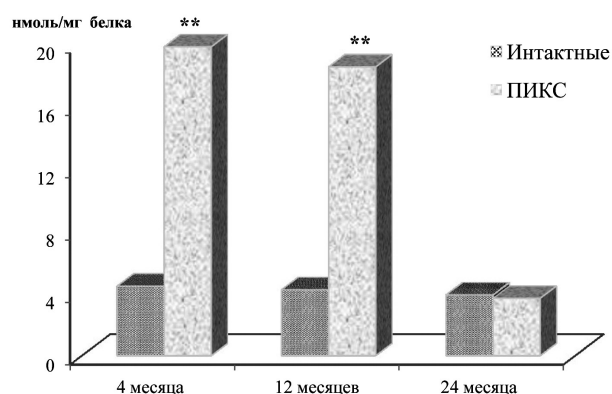


Рис. 2. Содержание продуктов карбонильной модификации белков (нмоль/мг белка) в образцах мембран эритроцитов крыс возрастом 4, 12 и 24 месяца в норме и в условиях постинфарктного кардиосклероза

Примечание. ** – уровень статистической значимости различий у интактных животных и животных с ПИКС в возрастной группе, $p < 0,01$.

Приведя аналогичные исследования в условиях сформировавшегося ПИКС, мы получили принципиально иной результат. Так, в эритроцитарных мембранах крыс 1-й и 2-й возрастных групп было выявлено значимое ($p < 0,01$), более чем в 4 раза, увеличение содержания карбонильных производных до 19,81 и 18,52 мкмоль/мг белка, соответственно. Напротив, в 3-й группе животных при ПИКС содержание карбонильных групп в белках эритроцитарных мембран осталось практически на уровне значения показанного для интактных животных.

Литература

1. Карпова Л.В., Аккуратов Е.Е., Бродская О.М., Болдырев А.А. Участие Na^+ -насоса в механизмах внутриклеточной сигнализации // Биофизика. – 2010. – Т. 55, № 6. – С. 1022-1029.
2. Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А. Активность перекисного окисления липидов и функциональное состояние миокарда при ремоделировании сердца крыс после экспериментального инфаркта // Кардиология. – 2007. – № 6. – С. 41-45.
3. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Медведева О.Д. Особенности перекисного окисления липидов у крыс разного возраста при постинфарктном кардиосклерозе // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 2. – С. 292-295.
4. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Путрова О.Д., Попов С.В. Возрастные особенности микровяз-

ности мембран эритроцитов при экспериментальном кардиосклерозе // Успехи геронтологии. – 2012. – Т. 25, № 4. – С. 644-647.

5. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int J Biochem Cell Biol. – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44-84.

6. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn R.-W., Shaltiel S., Stadman E. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Methods in Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.

7. Onishi S.T., Barr J.K. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 193-200.

Literature

1. Karpova L.V., Akkuratov E.E., Brodskaya O.M., Boldyrev A.A. The Na^+ pump and intracellular signaling mechanisms // Biophysics. – 2010. – Vol. 55, № 6. – P. 1022-1029.
2. Rebrova T.Yu., Kondratyeva D.S., Afanasyev S.A. Activity of lipid peroxidation and functional state of the myocardium in remodeling of rat heart after experimental myocardial infarction // Cardiology. – 2007. – № 6. – P. 41-45.
3. Rebrova T.Yu., Afanasyev S.A., Medvedeva O.D. Features of lipid peroxidation in rats of different age after postinfarction cardiosclerosis // Advances in gerontology. – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 292-295.
4. Rebrova T.Yu., Afanasyev S.A., Putrova O.D., Popov S.V. Age-related features of microviscosity of erythro-

cyte membranes in experimental cardiosclerosis // Advances in gerontology. – 2012. – Vol. 25, № 4. – P. 644-647.

5. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int J Biochem Cell Biol. – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44-84.

6. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn R.-W., Shaltiel S., Stadman E. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Methods in Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 464-478.

7. Onishi S.T., Barr J.K. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 193-200.

Координаты для связи с авторами: Реброва Татьяна Юрьевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики Научно-исследовательского института кардиологии, Томского национального исследовательского центра Российской академии наук, e-mail: rebrova@cardio-tomsk.ru; Афанасьев Сергей Александрович – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики Научно-исследовательского института кардиологии, Томского национального исследовательского центра Российской академии наук; Попов Сергей Валентинович – д-р мед. наук, академик РАН, директор Научно-исследовательского института кардиологии, Томского национального исследовательского центра Российской академии наук.

