

Возрастные особенности активности свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов и плазме крови при постинфарктном кардиосклерозе у крыс

Татьяна Юрьевна Реброва*, Сергей Александрович Афанасьев

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Реферат

Цель. У крыс разного возраста в интактном состоянии и с развившимся постинфарктным кардиосклерозом определить присутствие продуктов перекисного окисления липидов и белков в мембранах эритроцитов и плазме крови.

Методы. У крыс в возрасте 4, 12, 24 мес моделировали постинфарктный кардиосклероз методом коронароокклюзии. В плазме крови и мембранах эритроцитов определяли продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, и карбонильные производные аминокислотных остатков белков.

Результаты. В мембранах эритроцитов интактных животных 12 мес было отмечено уменьшение содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в сравнении с животными 4 мес, у животных 24 мес этот показатель значимо превышал значения у молодых особей. В плазме крови интактных животных в возрасте 12 и 24 мес выявлено повышенное содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, относительно крыс 4 мес. В условиях постинфарктного кардиосклероза отмечено увеличение накопления этих продуктов в мембранах эритроцитов животных 4 и 24 мес. В плазме крови повышение этого показателя было отмечено только в группе 4-месячных животных с постинфарктным кардиосклерозом. В мембранах эритроцитов интактных крыс всех возрастных групп не получено различий по уровню карбонильных производных аминокислотных остатков белков, в плазме крови с возрастом он достоверно увеличивается. У животных 4 и 12 мес с постинфарктным кардиосклерозом интенсивное повышение содержания карбонильных производных аминокислотных остатков белков наиболее выражено в эритроцитарных мембранах. У животных 24 мес с постинфарктным кардиосклерозом этот показатель в мембранах и плазме крови стабилен.

Вывод. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов клеточных мембран и крови имеет выраженные зависящие от возраста особенности, сохраняющиеся в условиях постинфарктного кардиосклероза; белки мембран эритроцитов интактных животных подвержены перекисной модификации в меньшей степени, чем белки плазмы крови; при формировании постинфарктного кардиосклероза у животных 4 и 12 мес карбонильные производные аминокислотных остатков белков интенсивнее накапливаются в мембранах эритроцитов по сравнению с плазмой крови.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, карбонильные производные белков, мембраны эритроцитов, постинфарктный кардиосклероз.

Для цитирования: Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А. Возрастные особенности активности свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов и плазме крови при постинфарктном кардиосклерозе у крыс. *Казанский мед. ж.* 2018; 99 (4): 629–634. DOI: 10.17816/KMJ2018-629.

Age-related features of activity of free radical oxidation in erythrocyte membranes and blood plasma in postinfarction cardiosclerosis in rats

T.Yu. Rebrova. S.A. Afanas'ev

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract

Aim. To determine the presence of lipid and protein peroxidation products in erythrocyte membranes and blood plasma in rats of different ages in an intact state and with developed postinfarction atherosclerosis.

Methods. In rats aged 4, 12, 24 months postinfarction atherosclerosis was modeled by coronary occlusion. In blood plasma and erythrocyte membranes, products reacting with thiobarbituric acid and carbonyl derivatives of protein amino acid residues were determined.

Results. In erythrocyte membranes of intact animals aged 12 months, a decrease of the content of thiobarbituric acid-reacting products was revealed in comparison with 4 month-old animals, and in 24 months-old animals the index significantly exceeded the values of young subjects. In the blood plasma of intact animals aged 12 and 24 months, an increased content of thiobarbituric acid-reacting products with respect to rats aged 4 months was revealed. In postinfarction atherosclerosis, an increase in the accumulation of thiobarbituric acid-reacting products was observed in erythrocyte membranes of 4 and 24 months-old animals. In blood plasma, an increase of this parameter was noted only in the group of 4 months-old animals with postinfarction atherosclerosis. In erythrocyte membranes of intact rats of all age groups, no differences in the level of carbonyl derivatives of protein amino acid residues were observed, and in blood plasma it significantly increased with age. In 4 and 12 months-old animals with postinfarction atherosclerosis, significant increase of carbonyl derivatives of protein amino acid residues was mostly pronounced in erythrocyte membranes. In 24 months-old animals with postinfarction atherosclerosis, this parameter in the membranes and blood plasma was stable.

Conclusion. The intensity of processes of cell membrane and blood lipid peroxidation has pronounced age-dependent features that persist in postinfarction atherosclerosis; proteins of erythrocyte membranes of intact animals are subject to peroxide modification to a lesser degree than blood plasma proteins; in postinfarction atherosclerosis formation in 4 and 12 months-old animals, carbonyl derivatives of protein amino acid residues are more intensively accumulated in erythrocyte membranes compared to blood plasma.

Keywords: lipid peroxidation, carbonyl derivatives of proteins, erythrocyte membranes, postinfarction atherosclerosis.

For citation: Rebrova T.Yu., Afanas'ev S.A. Age-related features of activity of free radical oxidation in erythrocyte membranes and blood plasma in postinfarction atherosclerosis in rats. *Kazan medical journal*. 2018; 99 (4): 629–634. DOI: 10.17816/KMJ2018-629.

В настоящее время выдвинуто несколько теорий старения, в том числе теория Хармана, согласно которой основной процесс, определяющий возрастные изменения, — усиление свободнорадикального повреждения клеток и их структур [1]. Известно, что оксидативный стресс представляет собой универсальное звено развития как возрастных изменений, так и патогенеза многих заболеваний [2–4]. Обусловлено это тем, что свободные радикалы легко вступают во взаимодействие с липидами и нуклеиновыми кислотами, карбоксильными, амидными и заряженными аминокислотными остатками белков, вызывая их окислительную модификацию [3]. Происходящие окислительные изменения молекул отражаются на активности ферментов, структурной целостности интегральных мембранных белков и липидного бислоя.

В кардиологии насущным вопросом остаётся изучение изменений, происходящих при ишемическом и реперфузионном поражении сердечной мышцы. Показано, что при развитии инфаркта миокарда создаются условия для неконтролируемого развития перекисных процессов [5]. Считают, что возрастной фактор

может иметь существенное влияние на интенсивность оксидативного повреждения при постинфарктном атеросклерозе (ПИКС).

Цель работы — у крыс разного возраста в интактном состоянии и с развившимся ПИКС определить присутствие продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков в мембранах эритроцитов и плазме крови.

Исследования выполнены на трёх возрастных группах самцов крыс линии Wistar:

- 4-месячные крысы с массой тела 200–250 г;
- 12-месячные крысы с массой тела 400–450 г;
- 24-месячные крысы с массой тела 500–550 г.

Работы с животными проводили согласно всем принципам гуманности, содержащимся в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), и в соответствии с Приказом Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Каждая возрастная группа была представлена 10 интактными крысами и 10 крысами с развившимся ПИКС. Моделирование ПИКС крысам выполняли, вызывая инфаркт миокарда

Таблица 1. Содержание реагирующих с тиобарбитуровой кислотой продуктов (ТБК-РП) в мембранах эритроцитов и плазме крови крыс разного возраста в интактном состоянии и при моделировании постинфарктного кардиосклероза (ПИКС), $M \pm m$

Группа	Показатель	ТБК-РП в мембранах эритроцитов, ммоль/мг белка	ТБК-РП в плазме крови, ммоль/л
Интактные крысы 4 мес (n=10), группа 1		11,51±1,12 $p_{1-2}=0,002$ $p_{1-3}=0,141$ $p_{1-5}=0,013$	20,57±2,69 $p_{1-2}=0,006$ $p_{1-3}=0,037$ $p_{1-5}=0,027$
Крысы с ПИКС 4 мес (n=10), группа 2		19,71±1,65 $p_{2-4}=0,002$ $p_{2-6}=0,007$	28,23±1,97 $p_{2-4}=0,002$ $p_{2-6}=0,007$
Интактные крысы 12 мес (n=10), группа 3		6,23±1,23 $p_{3-5}=0,003$ $p_{3-4}=0,391$	24,19±0,88 $p_{3-5}=0,112$ $p_{3-4}=0,004$
Крысы с ПИКС 12 мес (n=10), группа 4		6,86±0,97 $p_{4-6}=0,00006$	12,56±1,67 $p_{4-6}=0,003$
Интактные крысы 24 мес (n=10), группа 5		17,17±0,71 $p_{5-6}=0,0006$	23,18±1,75 $p_{5-6}=0,071$
Крысы с ПИКС 24 мес (n=10), группа 6		27,40±1,23	21,20±1,24

методом коронароокклюзии [5]. Окклюзию венечной артерии выполняли в стерильных условиях, под наркозом (телазол® внутримышечно в дозе 0,1 мг/кг). После торакотомии в верхней трети передней венечной (коронарной) артерии накладывали лигатуру. Рану засыпали антибиотиком и зашивали.

Оперированных крыс содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму в течение 42 сут. К этому сроку у экспериментальных животных формировался ПИКС, и их одновременно с интактными крысами выводили из эксперимента и производили забор крови.

Кровь забирали в пробирку с гепарином в соотношении 1:10. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин. Мембраны эритроцитов получали методом гипоосмотического гемолиза клеток по описанной ранее методике [6]. Полученную плазму крови и мембраны эритроцитов аликвотировали и хранили в низкотемпературном морозильнике при -80°C .

Присутствие продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов и плазме крови оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, определяя концентрацию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), при $\lambda=535$ нм [5].

Продукты окислительной модификации белков мембран эритроцитов определяли по реакции карбонильных производных аминокислотных остатков белков (КПБ) с 2,4-дини-

трофенилгидразином по методу R.L. Levine [7]. Метод основан на реакции взаимодействия окисленных до альдегидных и кетонных группировок (карбонильных групп) аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, имеющих максимум поглощения при $\lambda=370$ нм. Определение белка в мембранах эритроцитов выполняли микробиуретовым методом [8].

Оценку статистической значимости выявленных различий изучаемых показателей проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$.

В табл. 1 представлены данные, полученные при определении содержания ТБК-РП в мембранах эритроцитов интактных крыс рассматриваемых возрастных групп.

Видно, что значение этого показателя у крыс 24-месячного возраста в 1,6 раза превышает аналогичный показатель, полученный у животных 4 мес, и в 3,1 раза — 12-месячного возраста. Сопоставление этих данных свидетельствует о том, что выраженная активация ПОЛ в мембранах эритроцитов происходит при достижении крысами практически максимального для них срока жизни. И напротив, для крыс среднего возраста характерно снижение образования конечного продукта перекисидации липидов в мембранах эритроцитов. Такой результат, возможно, обеспечен высокой активностью антиоксидантных ферментов в эритроцитах.

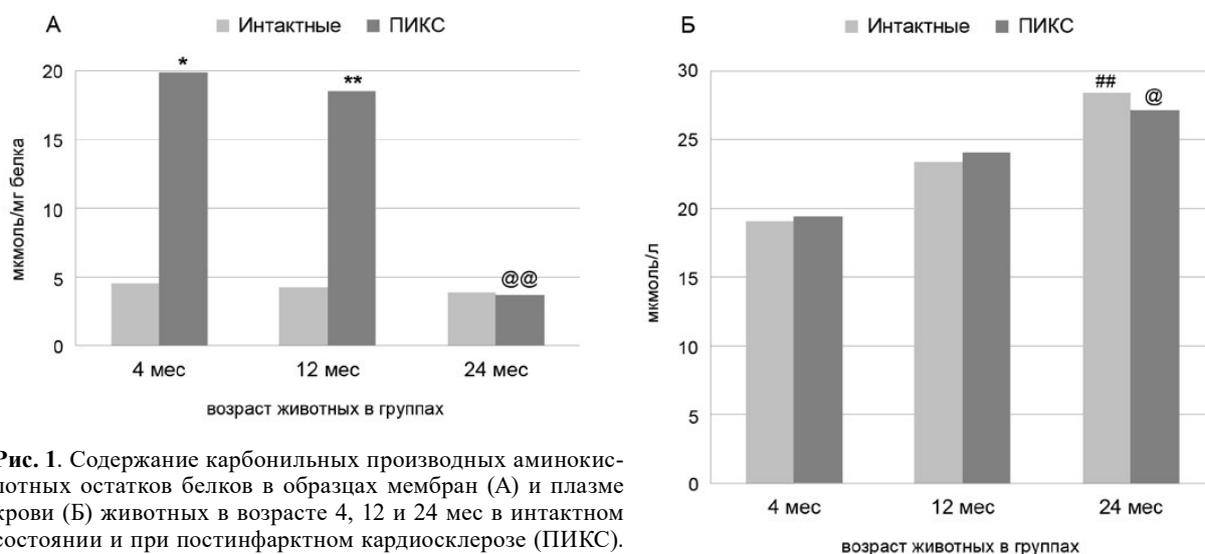


Рис. 1. Содержание карбонильных производных аминокислотных остатков белков в образцах мембран (А) и плазме крови (Б) животных в возрасте 4, 12 и 24 мес в интактном состоянии и при постинфарктном кардиосклерозе (ПИКС). Уровень значимости различий: у интактных животных разных возрастных групп — * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; у интактных животных и животных с ПИКС одного возраста — ## $p < 0,01$; у животных с ПИКС между группами в возрасте 4, 12 и 24 мес — @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,001$

При определении ТБК-РП в плазме крови интактных крыс наименьшее значение получено для группы 4-месячных крыс. Содержание ТБК-РП в пробах 12- и 24-месячных крыс было значительно выше.

Анализ полученных результатов позволяет сказать, что интенсивность процессов ПОЛ в отношении и мембран эритроцитов, и плазмы крови на рассматриваемых этапах онтогенеза крыс имеет свою специфику. У крыс в 12-месячном возрасте происходит активное накопление ТБК-РП в плазме крови, в то время как в мембранах эритроцитов — напротив, снижение их образования. В 24-месячном возрасте у крыс зарегистрировано накопление ТБК-РП как в плазме крови, так и в мембранах эритроцитов. Такое соотношение позволяет сделать вывод о генерализации процесса свободнорадикального окисления липидов и ослаблении антиоксидантной защиты в эритроцитах, а возможно — и в клетках других тканей.

Данные, полученные при определении ТБК-РП в образцах мембран эритроцитов и плазмы крови крыс с ПИКС, представлены в табл. 1. Оказалось, что в мембранах эритроцитов крыс 4- и 24-месячного возраста на фоне ПИКС происходит статистически значимое усиление образования ТБК-РП соответственно в 1,7 и 1,6 раза относительно интактных животных аналогичного возраста. В группе 12-месячных крыс формирование ПИКС не повлияло на интенсивность образования ТБК-РП в мембранах эритроцитов. Полученный результат свидетельствует о том, что именно у 12-месячных

крыс антиоксидантная активность в форменных элементах крови сохраняется наиболее полно и способна сдерживать неконтролируемое развитие ПОЛ.

Иное соотношение содержания ТБК-РП на фоне ПИКС получено для плазмы крови (см. табл. 1). Для 4-месячных крыс было характерно статистически значимое увеличение этого показателя в 1,3 раза относительно интактных животных этой возрастной группы. У 12-месячных крыс отмечено значимое уменьшение этого показателя в 1,9 раза в сравнении с показателями у интактных особей соответствующего возраста. В пробах плазмы крови 24-месячных крыс уровень ТБК-РП в условиях ПИКС не отличался от интактных значений у животных этого возраста.

Сопоставление полученных результатов позволяет сделать вывод, что у 4-месячных крыс в ответ на формирование ПИКС происходит активация свободнорадикальных процессов как в мембранах эритроцитов, так и в плазме крови. У крыс 12-месячного возраста такой активации не отмечено. Выявленное различие, вероятно, можно объяснить тем, что к этому возрасту у крыс формируются наибольшие компенсаторные возможности антиоксидантной системы как в мембранах эритроцитов, так и в плазме крови. Формирование ПИКС у крыс 24-месячного возраста сопровождается увеличением интенсивности ПОЛ только в мембранах эритроцитов.

На рис. 1 представлены результаты определения содержания КРБ в мембранах

эритроцитов (А) и плазме крови (Б). Видно, что в эритроцитах интактных крыс разного возраста этот показатель не имел значимых различий. Стабильность показателя КПБ позволяет предположить, что в процессе онтогенеза у крыс белки эритроцитарных мембран не подвергаются выраженной модификации активными формами кислорода, как это было отмечено при исследовании интенсивности свободнорадикальных процессов в липидах. Напротив, в плазме крови было выявлено значимое увеличение значения КПБ в зависимости от возраста животных. Так, значения КПБ в плазме крови 24-месячных крыс в 1,5 раза ($p < 0,01$) превышало аналогичный показатель у 4-месячных. Значимое увеличение показателя КПБ позволяет говорить о том, что процессе онтогенеза повышается интенсивность окисления активными формами кислорода аминокислотных остатков белков плазмы крови.

Содержание карбонильных групп в белках эритроцитарных мембран и плазмы крови рассматриваемых возрастных групп животных с ПИКС изменялось разнонаправленно. В эритроцитарных мембранах животных в возрасте 4 и 12 мес отмечено достоверно значимое увеличение содержания КПБ в 4,5 и 4,4 раза соответственно (см. рис. 1, А). В группе 24-месячных животных с ПИКС показатель КПБ в мембранах эритроцитов достоверно не отличался от показателя у интактных животных.

На рис. 1, Б представлены результаты определения содержания КПБ в плазме крови животных с ПИКС. Развитие ПИКС не привело к значимым изменениям этого показателя в сравнении с группами интактного возрастного контроля. Следует отметить, что в плазме крови животных 24 мес с ПИКС показатель КПБ значимо превышал значения в группах 4- и 12-месячных животных с ПИКС, что было характерно для крыс этой возрастной группы и в интактном состоянии. КПБ обладают большим периодом полураспада и выведения из организма [9], что выражается в их высоком содержании в образцах плазмы крови.

ВЫВОДЫ

1. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов мембран эритроцитов и плазмы крови имеет выраженные зависимости от возраста особенности, заключающиеся в снижении интенсивности свободнорадикального окисления липидов у животных 12 мес по сравнению с животными 4 мес и их активации у животных 24 мес. Отмеченные особенности

сохраняются в условиях постинфарктного ремоделирования миокарда.

2. Белки мембран эритроцитов в процессе онтогенеза животных подвержены перекисной модификации в меньшей степени, чем белки плазмы крови. При формировании постинфарктного кардиосклероза перекисное повреждение белкового компонента, наоборот, наиболее интенсивно протекает в эритроцитарных мембранах в сравнении с белками плазмы крови. Эта динамика отмечена у молодых животных и животных среднего возраста. У животных в возрасте 24 мес белковый компонент мембран стабилен в условиях патологической активации свободнорадикального окисления при постинфарктном кардиосклерозе.

*Работа выполнена в рамках темы
фундаментальных научных исследований
№АААА-А15-115123110026-3.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов по представленной статье.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н. *Молекулярные и физиологические механизмы старения*. СПб.: Наука. 2003; 468 с. [Anisimov V.N. *Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya*. (Molecular and physiological mechanisms of aging.) Saint Petersburg: Nauka. 2003; 468 p. (In Russ.)]
2. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты*. СПб.: Медицинская пресса. 2006; 400 с. [Dubinina E.E. *Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty*. (Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects.) Saint Petersburg: Meditsinskaya Pressa. 2006; 400 p. (In Russ.)]
3. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
4. Mirsa M.K., Sarwat M., Bhakuni P. et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med. Sci. Monitor.* 2009; 15: 209–219. PMID: 19789524.
5. Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А. и др. Активность перекисного окисления липидов и функциональное состояние миокарда при ремоделировании сердца крыс после экспериментального инфаркта. *Кардиология*. 2007; 6: 41–45. [Rebrova T.Yu., Kondrat'eva D.S., Afanas'ev S.A. et al. Activity of lipid peroxidation and functional state of the myocardium in remodeling of rat heart after experimental myocardial infarction. *Kardiologiya*. 2007; 6: 41–45. (In Russ.)]
6. Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Медведева О.Д. и др. Возраст-зависимые особенности микровязкости мембран эритроцитов при экспериментальном

кардиосклерозе. *Успехи геронтол.* 2012; 25 (4): 644–647. [Rebrova T.Yu., Afanas'ev S.A., Medvedeva O.D. et al. Age-related features of microviscosity of erythrocyte membranes in experimental cardiosclerosis. *Uspekhi gerontologii.* 2012; 25 (4): 644–647. (In Russ.)]

7. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymol.* 1990; 186: 464–478. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86141-H.

8. Onishi S.T., Barr J.K. A simplified method of

quantitating protein using the biuret and phenol reagents. *Annal. Biochem.* 1978; 86 (1): 193–200. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90334-2.

9. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. *Биомед. химия.* 2007; 53: 351–372. [Dubinina E.E., Pustygina A.V. Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological states. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2007; 53: 351–372. (In Russ.)]