

УДК 543.426.1:[543.635.4+ 547.554]:615.272.4:616.153.922:616.155.1-092.9

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС С ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ СИМВАСТАТИНА

Белюсова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Лосева Т.Д.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: belousovalena@mail.ru

В настоящий момент не существует исчерпывающего представления о сложном комплексе молекулярных механизмов, лежащих в основе структурно-функционального повреждения мышц при приеме статинов. Целью исследования явился анализ структурно-функциональных изменений мембран эритроцитов крыс с эссенциальной гиперхолестеринемией, получавших в течение длительного времени симвастатин (зокор). Животные были разделены на три группы: контрольная, группа сравнения (гиперхолестеринемия) и экспериментальная (животные с гиперхолестеринемией, получавшие в течение двух месяцев симвастатин). Установлено, что после длительного введения симвастатина большинство структурно-функциональных параметров мембран эритроцитов достигло значений контрольной группы, что указывает на устранение сдвигов, обусловленных гиперхолестеринемией. В то же время сохраняющееся повышенное значение микровязкости липидного бислоя отражает снижение эластичности и деформируемости клеточной мембраны. Изменение общей АТФ-азной активности после введения симвастатина в целом указывает на снижение вовлечения АТФ в процессы дефосфорилирования. Повышение активности Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы и снижение активности Ca^{2+} -зависимой АТФ-азы позволяет предположить формирование тенденции к нормализации Ca^{2+} -зависимого гомеостаза и активизации процессов, направленных на стабилизацию функциональной полноценности эритроцитов. Выявленные нами изменения активности мембранных АТФ-аз отражают нарушение гомеостаза важнейших катионов, что приводит к искажению регулирующего влияния внутриклеточных сигнальных систем, изменению активности ключевых ферментов и накоплению метаболитов, формируя дисрегуляторную патологию клеток крови и миоцитов. Поскольку препараты первого поколения статинов не теряют свою актуальность, можно полагать, что для снижения риска поражения мышц при их длительном приеме целесообразным является включение в схемы терапии препаратов, обладающих антигипоксическим, антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием.

Ключевые слова: эритроциты, экспериментальная гиперхолестеринемия, статины, мембраны, АТФ-аза

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN ERYTHROCYTE MEMBRANES OF RATS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA AFTER PROLONGED SIMVASTATIN INTAKE

Belousova E.S., Mikashinovich Z.I., Sarkisyan O.G., Loseva T.D.

Rostov State Medical University Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: belousovalena@mail.ru

At the moment, there is no comprehensive understanding of the complex set of molecular mechanisms underlying structural and functional muscle damage when taking statins. The aim of the study was to analyze the structural and functional changes in the membranes of rat erythrocytes with essential hypercholesterolemia, treated for a long time with simvastatin (zocor). The animals were divided into three groups: control, comparison group (hypercholesterolemia) and experimental (animals with hypercholesterolemia, receiving simvastatin for two months). It was found that after long-term administration of simvastatin most of the structural and functional parameters of erythrocyte membranes reached the values of the control group, which indicates the elimination of shifts due to hypercholesterolemia. At the same time, the continued high value of the microviscosity of the lipid bilayer reflects a decrease in the elasticity and deformability of the cell membrane. The change in total ATP-ase activity after administration of simvastatin, in general, indicates a decrease in the involvement of ATP in the processes of dephosphorylation. However, an increase in the activity of Mg^{2+} -dependent ATP-ase and a decrease in the activity of Ca^{2+} -dependent ATP-ase suggest the formation of a trend towards the normalization of Ca^{2+} -dependent homeostasis and the activation of processes aimed at stabilizing the functional usefulness of red blood cells. The revealed changes in the activity of membrane ATP-ase reflect the violation of homeostasis of the most important cations, which leads to a distortion of the regulatory influence of intracellular signaling systems, changes in the activity of key enzymes and the accumulation of metabolites, forming a dysregulation pathology of blood cells and myocytes. Taking into account that the drugs of the first generation of statins do not lose their relevance, it can be assumed that to reduce the risk of muscle damage with their long-term use, it is advisable to include in the treatment drugs that have antihypoxic, antioxidant and membranostabilizing effect.

Keywords: erythrocytes, experimental hypercholesterolemia, statins, membranes, ATP-ase

Статины относятся к наиболее эффективным гиполипидемическим средствам, считаются относительно безопасными препаратами и хорошо переносятся. Среди побочных эффектов этой группы лекар-

ственных средств наибольшее клиническое значение имеет специфическая лекарственная миопатия.

В современной медицинской литературе накоплен обширный фактический мате-

риал, посвящённый изучению патогенеза статиновой миопатии, однако не существует исчерпывающего представления о сложном комплексе молекулярных механизмов, лежащих в основе структурно-функционального повреждения мышц при приёме статинов.

Независимо от природы повреждающего агента, патофизиологический ответ клетки включает в себя ряд общих неспецифических реакций, одной из которых являются изменения в клеточной мембране [1].

Многочисленными исследованиями показано, что мембрана эритроцитов – наиболее доступная и удобная модель для изучения патобиохимических изменений в клетке при том или ином воздействии [2; 3]. Это связано с тем, что мембране эритроцитов присущи общие принципы организации плазматических мембран. При этом «простота» внутренней организации клетки даёт возможность изучать любые изменения без «помех», создаваемых внутриклеточными образованиями, и экстраполировать полученные результаты с небольшой поправкой на видовую специфичность тканей [4].

В то же время особенность структуры мембран эритроцитов позволяет им проходить через капилляры за счёт белок-белковых и белок-липидных контактов. Дефекты мембранных белков приводят к морфологическим и функциональным нарушениям эритроцитов, что сопровождается изменением реологических свойств крови.

В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ структурно-функциональных изменений мембран эритроцитов животных с гиперхолестеринемией, получавших в течение длительного времени симвастатин (зокор).

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах в возрасте 12–14 месяцев. Содержание животных соответствовало требованиям Приказа Минздрава РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и санитарным правилам СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 29.08.2014».

Контрольную группу составили 35 животных, которые содержались на общем рационе вивария и в течение 3 месяцев получали через пищеводный зонд 0,5 мл дистиллированной воды один раз в сутки.

У остальных животных индуцировали эссенциальную гиперхолестеринемию путём содержания в течение 3 месяцев на рационе, обогащённом животными жирами (топлёное сливочное масло) и легко усваиваемыми углеводами (тростниковый сахар, манная крупа). По истечении 3 месяцев у животных определяли уровень общего холестерина (ХС) на анализаторе Bayer (Германия). После подтверждения гиперхолестеринемии животные были разделены на две группы:

– группа 1 (сравнения) – 35 животных с гиперхолестеринемией, в течение 2 месяцев получавших рацион без добавления лекарственных веществ и 0,5 мл дистиллированной воды один раз в сутки через пищеводный зонд;

– группа 2 (экспериментальная) – 35 животных с гиперхолестеринемией, получавших в течение 2 месяцев симвастатин (Zocor, 20 мг) по 0,0012 г / 100 г массы один раз в сутки в виде водной суспензии через пищеводный зонд, что способствовало формированию статиновой миопатии.

По окончании срока эксперимента животных забивали декапитацией. Все манипуляции выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986).

Эритроциты получали из крови, стабилизированной гепарином (10 ед/мл), центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Для определения использовали суспензию эритроцитов в физиологическом растворе из расчёта 0,5 мг/мл.

Микровязкость липидной фазы и белок-липидных контактов определяли методом латеральной диффузии зонда пирена в суспензии мембран эритроцитов [5]. Для этого суспензию клеток инкубировали 1 мин. в спиртовом растворе пирена, конечная концентрация которого составляла 8 мкМ. Микровязкость липидного слоя оценивали при $\lambda_{\text{возб.}} = 334$ нм и $\lambda_{\text{флуор.}} = 395$ нм, микровязкость зон белок-липидных контактов при $\lambda_{\text{возб.}} = 395$ нм и $\lambda_{\text{флуор.}} = 470$ нм. Эффективность переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков на пирен оценивали по тушению флуоресценции суспензии мембран эритроцитов при длине волны возбуждения 282 нм и длине волны флуоресценции 330 нм в отсутствие и после инкубации с зондом пирена. Полярность зон белок-липидных контактов

оценивали по соотношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм $F = 372/393$.

Степень окислительной модификации белков суспензии мембран эритроцитов оценивали по интенсивности флуоресценции аминокислотных остатков. Интенсивность общей флуоресценции белков измеряли при $\lambda_{\text{возб.}} = 292$ нм и $\lambda_{\text{флуор.}} = 347$ нм, интенсивность флуоресценции ароматических аминокислот при $\lambda_{\text{возб.}} = 320$ нм и $\lambda_{\text{флуор.}} = 400$ нм, интенсивность флуоресценции поперечно сшитых белков при $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм и $\lambda_{\text{флуор.}} = 420$ нм.

Активность аденозинтрифосфатного ферментного комплекса (Mg^{2+} и Ca^{2+} – зависимой $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATF-азы}$) определяли по методу, основанному на расщеплении под влиянием фермента органических фосфорсодержащих соединений (АТФ) с образованием неорганического фосфата, который регистрировали по реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты. Результаты выражали в мкмоль/г Нв.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использова-

нием программы STATISTICA 10.0 и Microsoft Excel. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В эритроцитах животных с экспериментальной гиперхолестеринемией наблюдали значительное увеличение микровязкости липидного бислоя ($F = 334/395$) на 186,67% ($p < 0,001$) и выявлена тенденция к повышению микровязкости зон белок-липидных контактов ($F = 395/470$) на 18,38% ($p > 0,05$) относительно контрольной группы (табл. 1).

Микровязкость считается интегральным показателем, который зависит от насыщенности жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов, содержания холестерина, фосфолипидного состава и содержания белков [6]. Можно полагать, что выявленные изменения связаны с увеличением доли холестерина в клеточных мембранах, обусловленным развитием гиперхолестеринемии.

Таблица 1

Структурно-функциональные характеристики мембран эритроцитов животных исследуемых групп ($M \pm m, n = 35$)

Показатель	Контрольная группа	Группа сравнения (гиперхолестеринемия)	Экспериментальная группа (гиперхолестеринемия + симвастатин)
Микровязкость липидного бислоя ($F = 334/395$)	$0,0180 \pm 0,0004$	$0,0516 \pm 0,0019$ $p1 < 0,001$	$0,0320 \pm 0,0013$ $p < 0,001$ $p1 < 0,001$
Коэффициент поляриности зон белок-липидных контактов ($F = 372/393$)	$1,0478 \pm 0,086$	$1,8514 \pm 0,209$ $p1 < 0,001$	$0,9677 \pm 0,088$ $p < 0,001$ $p1 > 0,05$
Интенсивность флуоресценции поперечно-сшитых белков ($F = 360/420$)	$0,0796 \pm 0,004$	$0,0960 \pm 0,006$ $p1 < 0,01$	$0,0742 \pm 0,009$ $p < 0,05$ $p1 > 0,05$
Микровязкость зон белок-липидных контактов ($F = 395/470$)	$5,2238 \pm 0,309$	$6,1839 \pm 0,488$ $p > 0,05$ $p1 > 0,05$	$6,0069 \pm 0,754$ $p > 0,05$ $p1 > 0,05$
Интенсивность флуоресценции ароматических аминокислот ($F = 320/400$)	$0,0433 \pm 0,003$	$0,0300 \pm 0,002$ $p1 < 0,001$	$0,0471 \pm 0,004$ $p < 0,001$ $p1 > 0,05$
Общая интенсивность флуоресценции ($F = 292/347$)	$256,70 \pm 12,442$	$295,87 \pm 22,966$ $p1 > 0,05$	$277,38 \pm 27,772$ $p > 0,05$ $p1 > 0,05$

Примечание: p – достоверно относительно контрольной группы; p_1 – достоверно относительно группы сравнения.

Обращает на себя внимание увеличение коэффициента полярности зон белок-липидных контактов ($F = 372/393$) на 76,69% ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (табл. 1), что свидетельствует о повышении гидрофильности липидного бислоя и аннулярных (пограничных) липидов [6].

Параллельно были выявлены: тенденция к увеличению общей интенсивности флуоресценции ($F = 292/347$) на 15,26% ($p > 0,05$), достоверное увеличение интенсивности флуоресценции поперечно-сшитых белков ($F = 360/420$) на 20,60% ($p < 0,01$) и снижение интенсивности флуоресценции ароматических аминокислот на 30,72% ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Полученные данные указывают, что в условиях гиперхолестеринемии в мембранах эритроцитов формируются структурные изменения, характеризующиеся увеличением межмолекулярных сшивок между компонентами мембран, что приводит к повышению степени погружения интегральных белков в липидный бислой и изменению их функциональной активности.

При определении активности мембранных АТФ-аз (табл. 2) была выявлена тенденция к снижению общей АТФ-азной активности на 13,75% ($p > 0,05$) на фоне тенденции к повышению АТФ-азной активности в присутствии ионов Mg^{2+} на 23,92% ($p > 0,05$) и выраженного роста активности АТФ-аз в присутствии ионов Ca^{2+} на 110,41% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Учитывая важнейшую регуляторную роль ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , можно полагать, что в условиях гиперхолестеринемии структурно-функциональные изменения в мембране эритроцита запускают «аварийную перестройку» регуляторных белков, направленную на поддержание внутриклеточного гомеостаза, что подтверждается данными определения структурно-функциональных показателей мембран эритроцитов.

После длительного введения симвастина (экспериментальная группа) в эритроцитах животных установлено снижение микровязкости липидного бислоя на 38% ($p < 0,05$) и тенденция к снижению микровязкости зон белок-липидных контактов относительно группы сравнения. Относительно контрольной группы микровязкость липидного бислоя оставалась повышенной на 77,38% ($p < 0,001$), микровязкость зон белок-липидных контактов достоверно не отличалась (табл. 1).

В эритроцитах животных экспериментальной группы также выявлено снижение коэффициента полярности зон белок-липидных контактов на 47,43% ($p < 0,001$) и интенсивности флуоресценции поперечно-сшитых белков на 22,71% ($p < 0,01$), повышение интенсивности флуоресценции ароматических аминокислот на 57% ($p < 0,001$), общая интенсивность флуоресценции достоверно не изменилась относительно группы сравнения (табл. 1). Важно отметить, что после введения животным симвастина все показатели достоверно не отличались от значений контрольной группы.

Активность АТФ-аз в эритроцитах животных экспериментальной группы претерпела существенные изменения: так, выявлено снижение общей АТФ-азной активности на 71,64% ($p < 0,001$), снижение АТФ-азной активности в присутствии ионов Ca^{2+} на 60,72% ($p < 0,001$), активность АТФ-аз в присутствии ионов Mg^{2+} повысилась на 20,84% ($p < 0,05$) относительно группы сравнения (табл. 2). Относительно показателей контрольной группы общая АТФ-азная активность была снижена на 75,54% ($p < 0,001$), АТФ-азная активность в присутствии ионов Ca^{2+} на 17,36% ($p < 0,05$), активность АТФ-аз в присутствии ионов Mg^{2+} повышена на 49,75% ($p < 0,001$) (табл. 2).

Таблица 2

Активность мембранных АТФ-аз в эритроцитах животных исследуемых групп ($M \pm m$, $n = 35$)

Показатель	Контрольная группа	Группа сравнения (гиперхолестеринемия)	Экспериментальная группа (симвастин + гиперхолестеринемия)
АТФ-аза общ. (мкмоль/г Hb)	176,462 ± 25,537	152,191 ± 8,775 $p > 0,05$	43,163 ± 5,268 $p_1 < 0,001$
Ca^{2+} АТФ-аза (мкмоль/г Hb)	67,271 ± 5,947	141,546 ± 12,316 $p < 0,001$	55,593 ± 5,187 $p_1 < 0,001$
Mg^{2+} АТФ-аза (мкмоль/г Hb)	65,490 ± 7,329	81,158 ± 6,402 $p > 0,05$	98,071 ± 4,722 $p_1 < 0,001$

Примечание: p – достоверно относительно контрольной группы; p_1 – достоверно относительно группы сравнения.

Заключение

Анализируя представленный фактический материал, можно полагать, что длительное введение симвастатина экспериментальным животным способствует нивелированию структурно-функциональных сдвигов в мембранах эритроцитов, обусловленных гиперхолестеринемией, о чём свидетельствует достижение большинства показателей значений контрольной группы. В то же время сохраняющееся повышенное значение микровязкости липидного бислоя отражает снижение эластичности и деформируемости клеточной мембраны и, по-видимому, свидетельствует о снижении способности эритроцитов к прохождению через микроциркулярное русло, что имеет важнейшее значение для оценки реологических свойств крови.

Установленные изменения структурно-функционального состояния эритроцитов, очевидно, лежат в основе нарушения участия красных клеток в процессах коагуляции и, судя по характеру сдвигов белок-липидных контактов, могут способствовать формированию гиперкоагуляции в общем кровотоке.

В более ранних исследованиях нами установлено, что длительное введение симвастатина животных сопровождается гипоксическими изменениями в эритроцитах и миоцитах, характеризующимися снижением сродства гемоглобина к кислороду, развитием лактоацидоза, нарушением взаимодействий в системе ферментативных антиоксидантов [7].

Разобшение механизмов антиоксидантной защиты способствует активации свободно-радикального окисления в мембранах, что приводит к их уплощению или деструкции липидного слоя, укорочению жирных кислот, что приводит к нарушению транспортной функции мембран.

Изменение общей АТФ-азной активности после введения симвастатина в целом указывает на снижение вовлечения АТФ в процессы дефосфорилирования и, следовательно, о недостаточной обеспеченности биологической сохранности эритроцитов. Обращает внимание разнонаправленность сдвигов специфических АТФ-аз: достоверное усиление использования АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} и снижение активности Ca^{2+} -зависимой АТФ-азы позволяет полагать, что формируется тенденция к нормализации Ca^{2+} -зависимого гомеостаза и активируются процессы, направленные на стабилизацию функциональной полноценности эритроцитов. С другой стороны, со-

хранение повышенного уровня АТФ-азной активности в присутствии ионов Mg^{2+} может отражать снижение содержания внутриклеточного Mg^{2+} . Недостаток Mg^{2+} способствует изменению жирнокислотного состава мембранных липидов, что нашло отражение в повышении микровязкости липидного бислоя как в группе сравнения, так и в экспериментальной группе.

Принимая во внимание, что препараты первого поколения статинов не теряют свою актуальность, можно полагать, что для снижения риска поражения мышц при их длительном приёме целесообразным является включение в схемы терапии препаратов, обладающих антигипоксическим, антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием.

Список литературы / References

1. Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н. Дизрегуляционная патология нервной системы. М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2009. 512 с.
2. Gusev E.I., Kryzhanovsky G.N. Disregulation pathology of nerve system. М.: ООО «Medicinskoe informacionnoe agentstvo», 2009. 512 p. (in Russian).
3. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 3 (73). С. 334–354.
4. Borovskaya M.K., Kuznetsov E.E., Gorokhova V.G., Koriakina L.B., Kurilskaya T.E., Pivovarov Ju.I. Structural and functional characteristics of membranes erythrocyte and its change at pathologies of various genesis // Byulleten VSNC SO RAMN. 2010. №3 (73). P. 334–354 (in Russian).
5. Ишутина Н.А. Влияние состава полиненасыщенных жирных кислот на микровязкость мембраны эритроцитов пуповинной крови // Бюллетень сибирской медицины. 2013. Т. 12. № 3. С. 37–40.
6. Isutina N.A. Influence of composition of polyunsaturated fatty acids on microviscosity of the membrane of erythrocytes of the navel of the blood at herpes infection contaminations // Byulleten sibirskoy meditsiny. 2013. V. 12. № 3. P. 37–40 (in Russian).
7. Горис А.П., Зарубина Е.Г., Москвин С.В. Зависимость деформируемости эритроцитов от возраста человека // Лазерная медицина. 2013. Т. 17. № 2. С. 24–26.
8. Goris A.P., Zarubina E.G., Moskvina S.V. Dependence of Erythrocyte deformability on the human age // Lazernaya meditsina. 2013. V. 17. № 2. P. 24–26 (in Russian).
9. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. С. 191–206.
10. Dobrezov G.E. Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins. М.: Nauka, 1989. P. 191–206 (in Russian).
11. Саидов М.Б., Халилов Р.А. Структурно-динамические параметры мембран эритроцитов при гипотермии и введении даларгина // Успехи современного естествознания. 2013. № 11. С. 73–75.
12. Saidov M.B., Halilov R.A. Structural and dynamic parameters of the erythrocyte membranes under hypothermia with dalargin introduction // Advances in current natural sciences. 2013. № 11. P.73–75 (in Russian).
13. Белоусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г. Гипоксия как патофизиологическая основа изменения метаболических процессов в эритроцитах и гепатоцитах крыс после длительного приёма симвастатина (зокора) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015. Т. 59. № 4. С. 93–96.
14. Belousova E.S., Mikashinovich Z.I., Sarkysjan O.G. Hypoxia as functional base of metabolic processes changes in erythrocytes and hepatocytes of rats after prolonged Simvastatin (Zokor) intake // Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015. V. 59. № 4. P. 93–96 (in Russian).