

ЗМІНИ ЛІПІДНОЇ СТРУКТУРИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КАРДІОМІОЦИТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗУ

У статті наведено результати дослідження зміни ліпідної структури плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу. Встановлено, що вже на ранніх етапах розвитку експериментального атеросклерозу спостерігаються кількісні та якісні зміни в ліпідному складі мембран кардіоміоцитів, що супроводжуються активацією вільнорадикального окислення ліпідів та пригніченням Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності мембран. Ці зрушення можуть лежати в основі механізмів змін фізико-хімічних властивостей мембран, зокрема електричних та скоротливих.

Відомо, що всі фундаментальні властивості клітин серця — здатність до збудження, провідності та скоротливості залежать від структурно-функціонального стану їх плазматичних мембран.

Плазматична мембрана, згідно із сучасним уявленням, є рухомою, універсальною структурою, яка, крім бар'єрної функції, поєднує цілий ряд інших функцій — рецепторну, антигенну, транспортну, регуляторну та ін., що забезпечують структурно-функціональну цілісність клітини, підтримку на необхідному рівні інтенсивності обмінних процесів, іонного гомеостазу, їх нейрогуморальну та гормональну регуляцію. В той же час вона є першим об'єктом для будь-яких фізіологічних або патологічних впливів [1,2,7].

На сьогодні найбільш розповсюдженими є захворювання серцево-судинної системи, а саме — атеросклероз, ішемічна хвороба серця та інфаркт міокарда як крайній прояв останньої.

Нині загальноприйнятим у науковому обігу є визначення атеросклерозу як хронічного захворювання артерій, що викликається розростанням множинних щільних вузлуватих потовщень стінок судин (бляшок), які звужують їх просвіт та сприяють тромбоутворенню. Розвивається атеросклероз внаслідок складних структурних змін в інтимі (внутрішньому шарі) та медії (м'язовому шарі) артерій, які характеризуються на першому етапі накопиченням ліпідів та холестерину у вигляді позаклітинних ліпідних часток та масивних відкладень естерифікованого холестерину у складі пінистих клітин, а на більш пізній стадії — розростанням сполучної тканини та збільшенням холестерино-фіброзних і кальцієвих відкладень [4, 6, 13, 16, 19].

У широкому розумінні атеросклероз трактується як імунно-запальна відповідь внутрішньої оболонки судини на пошкодження, що ініціюються ліпідами, які в процесі оксидативної модифікації стають токсичними для ендотеліоцитів, викликають запальну відповідь, що і обумовлює потовщення внутрішньої оболонки та утворення атеросклеротичної бляшки [4, 8]. На розвиток атеросклерозу активуючий вплив мають також вірусні та бактеріальні інфекції. В результаті відбувається інвазія в стінку судини лейкоцитів з подальшим потовщенням внутрішньої оболонки та виникненням атеросклеротичної бляшки.

До цього часу найбільш вивченими є питання, пов'язані з механізмами збільшення атерогенного потенціалу крові, проникності судинної стінки, її взаємовідносинами з компонентами крові та розвитком атеросклеротичного процесу [6, 7, 9, 12].

Проте і досі недостатньо вивчено плазматичні мембрани кардіоміоцитів за умов атеросклерозу на різних стадіях його розвитку. Більш того, багато дослідників вважають, що атеросклероз — це локальна патологія судин, і серце при цьому залишається інтактним до останніх стадій розвитку патології. Інформації про стан структури та функцій мембран кардіоміоцитів при атерогенних порушеннях ліпідного обміну, зокрема на ранніх етапах розвитку гіперхолестеринемії без грубих наявних уражень судин, в літературі на сьогодні обмаль.

Враховуючи універсальний характер будови та складу біологічних мембран в організмі, важко припустити, що в умовах атерогенної гіпер-

холестеринемії кардіоміоцити та їх мембранний апарат не беруть участі у загальному патогенетичному ланцюгу подій, які ведуть до ураження серцево-судинної системи при атеросклерозі та ішемічній хворобі серця.

В той же час знання стану плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов гіперхолестеринемії може стати основою для ефективного пошуку та розробки підходів і засобів профілактики та лікування атеросклеротичних пошкоджень серця й судин, а також їх наслідків.

Тому метою даної роботи було встановлення характеру змін структурно-функціонального стану плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментальної гіперхолестеринемії.

Матеріали та методи

Експериментальну гіперхолестеринемію моделювали на безпородних кролях масою тіла 2,8–3,0 кг шляхом додавання в раціон тварин холестерину в дозі 0,5 г на 1 кг маси тіла кожного дня упродовж 2 місяців.

Наприкінці другого місяця годування суспензією холестерину у тварин проводили контрольні дослідження наявності ділянок ураження судинної стінки (аорти). При цьому було встановлено ділянки ліпідної інфільтрації з формуванням атероматозної бляшки різної стадії розвитку. Спеціальне забарвлення уражених ділянок ліпофільною фарбою Суданом чорним підтверджувало наявність холестерину та ліпопротеїдів у даних ділянках. Наприкінці 2-го місяця уражені ділянки та атероматозні бляшки займали майже 1/3 поверхні судинної стінки.

Слід відмітити, що на кінець другого місяця у піддослідних тварин у сироватці крові достовірно підвищувалася концентрація холестерину, тригліцеридів, жирних кислот та малонового діальдегіду відповідно в 4,8, 2,2 та 2,3 раза в порівнянні з контрольними величинами. В усіх серіях досліджень кількість дослідів та вимірювань кожного показника була не менша 10. При цьому для виділення та очистки плазматичних мембран кардіоміоцитів у кожному окремому досліді брали міокард 3 і більше тварин.

Експерименти проведені із врахуванням вимог гуманного ставлення до тварин, під етаналовим наркозом у дозі 30 мг на 1 кг маси тіла внутрішньовенно.

По закінченні експерименту із міокардів піддослідних тварин отримані та очищені везикульовані фрагменти сарколеми кардіоміоцитів із застосуванням диференційного ультрацентрифування за методом Louis P. J. [17]. Про чистоту отриманого препарату мембран робили висновки на основі визначення активності маркерного ферменту Na^+ , K^+ -АТФ-ази з використанням за-

гальновідомої в літературі методики [3]. Вміст ліпідних компонентів у структурі плазматичних мембран — холестерину, фосфоліпідів, жирних кислот — визначали в хлороформ-метанолових екстрактах мембранних структур, що отримані за методом Folch J. M. з співавт. [15] з використанням біохімічного автоматичного аналізатора "Express-550" (Ciba-Corning, Великобританія) і діагностичних тест-систем, реагентів фірми.

Вміст лізофосфоліпідів визначали шляхом вимірювання концентрації неорганічного фосфату, який міститься у відповідній фракції, отриманій за методом тонкошарової хроматографії в силікагелі [5].

Про інтенсивність процесів ПОЛ робили висновок за вмістом первинних та кінцевих продуктів цих реакцій — дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, який визначали спектрофотометрично за методами, описаними в літературі [10, 11].

Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази вимірювали за приростом у середовищі інкубації неорганічного фосфату, який утворився в результаті ферментативної реакції між ферментом та субстратом — АТФ [3]. Інкубаційне середовище при цьому містило: в 1 мл об'єму — 5 мМ MgCl_2 , 140 мМ NaCl , 40 мМ KCl , 3 мМ АТФ і 50 мМ тріс- HCl (рН 7,4), $t = 37^\circ\text{C}$. Реакцію запускали внесенням в інкубаційну суміш 100 мкг білка мембрани і проводили упродовж 10 хв. Концентрацію неорганічного фосфату визначали спектрофотометрично [14].

Вміст білка в мембранних препаратах визначали за Лоурі [18].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики на персональному комп'ютері з використанням програми STATGRAFICS. Числові дані представлені в формі середньої величини з стандартною помилкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

Результати дослідження та обговорення

Проведені дослідження показали, що експериментальний атеросклероз супроводжується змінами основних класів ліпідів: холестерину та фосфоліпідів (табл. 1). Так, рівень холестерину в плазматичних мембранах достовірно збільшується на 35 %, а рівень фосфоліпідів зменшується на 37,2 % порівняно з контролем. При цьому щільність упаковки ліпідного матриксу, що виражається в молярному співвідношенні холестерину до фосфоліпідів, збільшується в 2,2 раза з $1,26 \pm 0,13$ до $2,72 \pm 0,21$. Таке накопичення холестерину в мембранах і водночас зниження вмісту фосфоліпідів може стати важливим чинником впливу на їх основні властивості — бар'єрні,

транспортні, рецепторні, а також на провідність, збудливість, скоротливу здатність та ритмічну діяльність.

Крім вказаних кількісних змін, при експериментальному атеросклерозі відбуваються зміни і якісного складу ліпідів мембран (табл. 2). Зокрема, спостерігається достовірне збільшення в мембранах вмісту окислених форм фосфоліпідів — лізофосфоліпідів — на 42,3 % та приріст продуктів гідролізу фосфоліпідів — жирних кислот — на 45,2 % порівняно з контрольними величинами.

Таким чином, вся наведена низка кількісних та якісних змін показників стану ліпідного бішару мембран при експериментальному атеросклерозі призводить до зміни фізико-хімічних властивостей плазматичних мембран кардіоміоцитів, що відбивається на їх основних властивостях — збудливості, провідності, ритмічній діяльності, скоротливій здатності тощо.

Універсальним механізмом вказаних змін ліпідної структури мембран за умов експериментальної гіперхолестеринемії може бути інтенси-

фікація вільнорадикальних процесів окислення, що встановлена в наших дослідженнях (табл. 3), і основним субстратом яких є фосфоліпиди та жирні кислоти. Так, рівень первинних продуктів ПОЛ — дієнових кон'югатів — достовірно збільшується на 101,4%, а кінцевих — малонового діальдегіду — на 229 % порівняно з величинами цих показників у контрольних тварин.

Встановлені нами кількісні та якісні зміни структури мембран можуть стати важливим механізмом зміни активності багатьох мембранозв'язаних ферментних систем, зокрема Na^+ , K^+ -АТФ-ази, яка досліджувалася в даній роботі (табл. 4). Так, при експериментальному атеросклерозі каталітична активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази достовірно знижується на 28,2 % в порівнянні з контролем. Встановлена нами зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази може лежати в основі порушень іонних градієнтів, електрофізіологічних властивостей, потенціалу спокою та дії клітин серця тощо.

Таким чином, отримані результати дозволяють нам стверджувати, що вже на ранніх етапах

Таблиця 1

Основні ліпідні компоненти структури плазматичних мембран кардіоміоцитів при експериментальному атеросклерозі

Умови експерименту	Стат. показники	Холестерин мкмоль/мг білка	Фосфоліпиди мкмоль Фн/мг білка	Молярне співвідношення Хс/Фл
Контроль	М	120,0	95,0	1,26
	± м	10,0	7,0	0,13
Експериментальний атеросклероз	М	162,0*	59,6*	2,72*
	± м	18,0	6,1	0,21

* Різниця достовірна в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Вміст продуктів гідролізу та окиснення ліпідів плазматичних мембран кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу

Умови експерименту	Стат. показники	Лізофосфоліпиди мкмоль Фн/мг білка	Жирні кислоти мкг/мг білка
Контроль	М	0,130	65,40
	± м	0,02	7,3
Експериментальний атеросклероз	М	0,185*	95,0*
	± м	0,03	4,8

* Різниця достовірна в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

розвитку експериментального атеросклерозу спостерігаються кількісні та якісні зміни в ліпідному складі мембран кардіоміоцитів, у виникненні яких важливу роль може відігравати активація вільнорадикального окислення ліпідів. Встановлені структурні зміни та пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран можуть

обумовити порушення електричних та скоротливих властивостей кардіоміоцитів за даних умов.

Робота виконана на базі відділу біохімії Інституту кардіології ім. акад. М. Д. Стражеска АМН України під керівництвом доктора медичних наук, професора Л. С. Мхітарян.

Таблиця 3

Вміст продуктів ПОЛ в плазматичних мембранах кардіоміоцитів при експериментальному атеросклерозі

Умови експерименту	Стат. показники	Дієнові кон'югати E_{232} -г ⁻¹ білка	Малоновий диальдегід мкмоль/мг білка
Контроль	М	29,0	0,31
	± м	2,2	0,03
Експериментальний атеросклероз	М	58,4*	1,02*
	± м	5,3	0,09

* Різниця достовірна в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в сарколемі кардіоміоцитів за умов експериментального атеросклерозу

Умови експерименту	Стат. показники	Контроль	Експериментальний, атеросклероз
Активність Na^+ , K^+ - АТФ-ази мкмоль Фн/мг білку-год ⁻¹	М	8,50	6,10*
	± м	0,67	0,52

* Різниця достовірна в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

1. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов.— М: Изд-во МГУ, 1985.— 208 с.

2. Введение в биомембранологию / Под ред. А. А. Болдырева.— М: Изд-во МГУ, 1990.— 208 с.

3. Даниленко М. П., Ким Э. А., Омарова Р. Д. Действие ацетилхолина на Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность разных препаратов сарколеммы миокарда // Вопросы медицинской химии.— 1983,—Т. 29.—№ 1.—С. 29—33.

4. Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б. Окислительная модификация липопротеинов низкой плотности // Успехи современной биологии.— 1996.— Т. 116.— Вып. 6.— С. 729—748.

5. Кейтс М, Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов.— М.: Мир, 1975.— С. 257—290.

6. Климов А. Н., Никольцева Н. Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз.— СПб.: Питер, 1995.— 298 с.

7. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Барабой В. А., Сутковой Д. А.; Под общ. ред. Зозули Ю. А.— К.: Наукова думка, 1997.— 420 с.

8. Плюш Г. И., Воронков Г. С. Роль свободнорадикальных процессов в возникновении и прогрессировании атеросклероза // Український кардіологічний журнал.— 1998,— № 7—8.— С. 90—93.

9. Поляков А. Е., Проколова Т. Н. Липиды, липопротеиды, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца // Український кардіологічний журнал.— 1998.— № 9.— С. 5—10.

10. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977,— С. 63—64.

11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977.— С. 66—68.

12. Титов В. Н. Клиническая химия атеросклероза // Клиническая лабораторная диагностика.— 1998.— № 4.— С. 3—13.

13. A Handbook of Hiperlipidaemia /By GR Thompson.— London:Merck, Scharp and Dohme, 1989.— 236 p.

14. *Fiske S. H., Subarrow J.* The colorimetric determination of phosphorus *II* *J. Biol. Chem.*— 1925.— Vol. 66.— P. 375.
15. *Folch J. M., Lees G. H., Shane-Stanley A.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues *II* *J. Biol. Chem.*— 1957.— Vol. 226.— P. 497—509.
16. *Grundy S. M.* Cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease.— New York: MSD, 1990.— 38 p.
17. *Louis P. J., Sulakhe P. V.* Isolation of sarcolemma membranes from cardiac muscle *II* *Int. J. Biochem.*— 1976.— Vol. 77.— P. 547—558.
18. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent *II* *J. Biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193,— N 1.— P. 265—276.
19. Recent progress in atherosclerosis research *I* Ed.: E. Vollmer, A. Roessner.— Berlin etc.: Springer, 1993.— 255 p.

Kuchmenko O. B.

THE CHANGES OF LIPID STRUCTURE OF PLASMA MEMBRANES OF CARDIOMYOCYTES ON THE CONDITION OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

The results of research of changes of lipid structure of plasma membranes of cardiomyocytes in this article are given. There are arranged that the quantitative and qualitative modifications of lipid matrix of plasma membranes of cardiomyocytes on the early stages of development of experimental atherosclerosis are observed. These changes are accompanied by activation of free-radical peroxidation, oppression of Na^+ , K^+ - ATPase activity and can be in the basis of mechanisms of modification physical and chemical properties of membranes, in particular electrical and contractive.