

**В. Н. Швец**

*Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины,  
69091 Запорожье*

## **ФОСФОЛИПИДНАЯ СТРУКТУРА МИОКАРДА И ЕЕ МОДУЛЯЦИЯ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ**

В опытах на взрослых (10–12 мес) и старых (22–25 мес) крысах определяли фосфолипидный спектр гомогенатов сердца, а также характер его модуляции при иммобилизационном стрессе и в условиях стимуляции индуцированного перекисного окисления липидов. Было установлено, что стресс сопровождается формированием метаболических сдвигов, направленных на ограничение чувствительности миокарда к инициации в нем цепных свободнорадикальных процессов. Показано, что в основе их проявления лежит уменьшение доли фосфолипидов с ненасыщенной структурой в фосфолипидном спектре сердца. Этот механизм ограничения инициации цепных свободнорадикальных процессов в миокарде, проявляется в большей мере у старых, чем у взрослых животных.

**Ключевые слова:** фосфолипидный спектр, перекисное окисление липидов, старение, миокард, иммобилизационный стресс.

Характерной чертой старения является снижение адаптации организма к действию повреждающих факторов стресса [5, 7, 9]. Однако молекулярные механизмы развития данного феномена все еще окончательно не изучены. Принимая во внимание особую роль стимуляции свободнорадикальных процессов в формировании стрессорных повреждений внутренних органов [2, 6, 10], было поведено исследование фосфолипидного спектра гомогенатов сердца взрослых и старых крыс, а также характера его модуляции при иммобилизационном стрессе и в условиях стимуляции индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ), что и стало целью данной работы.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 40 крысах-самцах линии Вистар, подразделенных на две группы: взрослые (10–12 мес) и

старые (22–25 мес), в каждой из которых были две подгруппы: 1 — интактные и 2 — подвергавшиеся иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 мин. Эффективность развития стресса контролировали по повышению уровня адреналина в крови.

После прекращения иммобилизации животных декапитировали. Сердце извлекали и отмывали от крови. Выделяли миокард левого желудочка и гомогенизировали с 0,1 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,5). Приготовленные 10 % гомогенаты делили на 2 части: одну из них использовали для экстракции фосфолипидов, другую добавляли в реакционную смесь, которая содержала в своем составе систему для стимуляции НАДФН-зависимого ПОЛ [4]. В этом случае пробы инкубировали в течение 15 мин при 37 °С, после чего из них отбирали аликваты для последующей экстракции липидов [1].

Фракционирование фосфолипидов липидного экстракта проводили при помощи двухмерной тонкослойной хроматографии на пластинах "Kieselgel-60" размером 7,0 × 7,0 см (Merk, США). Для разделения использовали две различные системы растворителей. Система 1 состояла из смеси — хлороформ : метанол : бензол : конц. NH<sub>4</sub>OH (32,5 : 15 : 5 : 3). Система 2 состояла из смеси — хлороформ : метанол : бензол : ацетон : ледяная уксусная кислота : вода (35 : 15 : 5 : 2,5 : 2 : 0,5).

Идентификацию фосфолипидов на пластинках после разделения проводили с использованием величины *R<sub>f</sub>* и их дифференциальной окраски [1]. Разделенные фракции соскабливали с пластинок и экстрагировали реактивом Фолча [1]. Экстракты выпаривали и минерализовали с хлорной кислотой при 180 °С в течение 20 мин. В минерализатах определяли содержание неорганического фосфора с использованием реактива Васьковского [9]. Концентрацию белка в гомогенатах определяли методом Лоури [7].

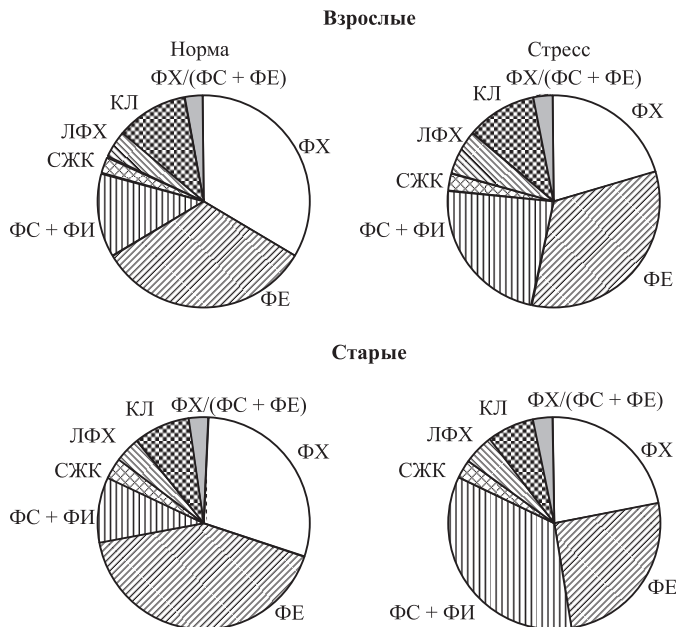
Различия средних величин показателей в группах оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования показали, что в фосфолипидном спектре миокарда старых интактных крыс по сравнению со взрослыми интактными была повышена в среднем на 20 % доля лизофосфатдилхолина (ЛФХ), а также фосфатидилэтаноламина (ФЕ) и, наоборот, на 17 % была снижена доля фосфатидилхолина (ФХ), (рисунок).

При стрессе у животных обеих возрастных групп возникали однонаправленные изменения фосфолипидной структуры миокарда. Они проявлялись в резком уменьшении доли ФХ и ФЕ, а также в накоплении ЛФХ и фракции, которая содержит в своем составе фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол (ФС + ФИ).

Вместе с тем, в условиях стресса у животных формировались и некоторые возрастные различия в характере модификации фосфолипидной структуры сердца. Так, у взрослых крыс при иммобилизации происходило резкое уменьшение доли ФХ, а у старых — доли ФЕ в фосфолипидном спектре. Увеличение содержания фосфолипидной фракции,

которая содержит в своем составе **ФС** и **ФИ**, было более значительным в сердце старых крыс, а **ЛФХ** — у взрослых.



Распределение фосфолипидов и свободных жирных кислот (СЖК) в гомогенатах сердца (%) крыс разного возраста в норме и после иммобилизационного стресса; КЛ — кардиолипин, ФЕ — фосфатидилэтаноламин, ФХ — фосфатидилхолин, ЛФХ — лизофосфатидилхолин, ФС — фосфатидилсерин, ФИ — фосфатидилинозитол.

Полученные данные свидетельствуют о том, что базальные возрастные различия в структуре фосфолипидного спектра миокарда приводят к появлению особенностей в изменении фосфолипидного состава сердца при стрессе у животных обеих возрастных групп. В свою очередь, формирование возрастных особенностей в фосфолипидной организации сердечной мышцы предопределяет изменение чувствительности липидного бислоя мембран кардиомиоцитов к действию повреждающих внешних факторов. Для проверки данного положения далее было проведено изучение особенностей модификации фосфолипидного состава миокарда в ответ на стимуляцию ПОЛ как одного из центральных звеньев патогенеза стрессорного повреждения сердца [2, 6, 10].

Фосфолипидная структура миокарда животных обеих возрастных групп имела относительно высокую устойчивость к эффекту индуцированного ПОЛ (таблица). Единственным изменением, возникавшим в этих условиях, было накопление ЛФХ в гомогенатах сердца взрослых интактных крыс. В гомогенатах сердца старых животных аналогичного изменения не наблюдалось. Не было его также и у взрослых крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

**Влияние стимулированного перекисного окисления липидов на содержание отдельных фосфолипидов в гомогенатах сердца крыс разного возраста в норме и после иммобилизационного стресса, мкг  $P_{неорг.}$ /мг белка ( $M \pm t$ )**

Группа	Фосфатидилхолин	Фосфатидилэтаноламин	Фосфатидилсерин + фосфотидилинозитол	Лизофосфатидилхолин	Кардиолипин	$\Phi X / (\Phi C + \Phi E)$
Взрослые крысы						
До инкубации в условиях стимулированного ПОЛ						
Интактные	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,19 ± 0,03	1,2 ± 0,1	0,75
Стресс	1,7 ± 0,2*	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,4*	0,49 ± 0,11*	1,2 ± 0,1(6)	0,38
После 15-минутной инкубации в условиях стимулированного ПОЛ						
Интактные	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,32 ± 0,04	1,1 ± 0,1	0,76
Стресс	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,4*	0,51 ± 0,06*	1,0 ± 0,1	0,43
Старые крысы						
До инкубации в условиях стимулированного ПОЛ						
Интактные	2,8 ± 0,3	3,9 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,0 ± 0,1	0,32 ± 0,03 <sup>#</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,57
Стресс	1,8 ± 0,2*	2,0 ± 0,1*	2,8 ± 0,6*	0,42 ± 0,04	1,20 ± 0,04*	0,38
После 15-минутной инкубации в условиях стимулированного ПОЛ						
Интактные	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,6 <sup>#</sup>	0,9 ± 0,1	0,30 ± 0,03	1,7 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,57
Стресс	1,9 ± 0,1	2,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,41 ± 0,04	1,3 ± 0,1	0,55

*Примечания:* в каждой группе по 6 животных; \* —  $P < 0,05$  по сравнению с интактными данной группы, <sup>#</sup> —  $P < 0,05$  по сравнению с соответствующими показателями взрослых крыс.

Отсутствие эффекта накопления ЛФХ в гомогенатах сердца взрослых стрессированных крыс в условиях стимулированного ПОЛ могло быть обусловлено активацией при стрессе метаболических процессов, связанных с утилизацией лизофосфатидов в миокарде или их рециклированием. Учитывая особую роль лизофосфатидов в повреждении кардиомиоцитов [2], можно предполагать адаптивный характер подобной перестройки обмена веществ в сердечной мышце.

В отличие от взрослых крыс инкубация гомогенатов сердца в условиях стимулированного ПОЛ у старых иммобилизованных животных сопровождалась изменением суммарного содержания в них ФС и ФИ. Возникающие при этом резкое снижение концентрации ФС и параллельное увеличение уровня ФЕ в миокарде могут быть обусловлены у них усилением скорости декарбоксилирования ФС.

Модификация фосфолипидного состава гомогенатов сердца, которая возникает в условиях индуцированного ПОЛ, очевидно, имеет характер приспособительной реакции, направленной на уменьшение чувствительности миокарда к повреждающему действию перекисного окисления. Это связано с тем, что подобного рода модуляция фосфолипидного спектра сопровождается повышением общего уровня насыщенности фосфолипидов и, следовательно — их устойчивости к инициации свободнорадикальных процессов [2, 3].

Принимая во внимание тот факт, что среди других представителей фосфолипидов наибольшей насыщенностью структуры обладает ФХ, а наименьшей — ФС, ФЕ и ФИ [3], для подтверждения высказанного предположения нами была рассчитана величина соотношения  $\text{ФХ}/(\text{ФС} + \text{ФЕ})$ . Расчеты показали, что у интактных крыс обеих возрастных групп изменений величины данного показателя после 15-минутной инкубации гомогенатов сердца в условиях стимулированного ПОЛ не наблюдалось.

У животных, подвергнутых иммобилизации, величина  $\text{ФХ}/(\text{ФС} + \text{ФЕ})$  снижалась по сравнению с интактными крысами. При этом у взрослых животных она составляла 50 %, а у старых — 75 % величины соответствующего показателя у интактных крыс соответствующей возрастной группы. В то же время, инкубация гомогенатов сердца стрессированных крыс в условиях стимулированного ПОЛ сопровождалась повышением величины  $\text{ФХ}/(\text{ФС} + \text{ФЕ})$  на 13 % и 45 %, соответственно, у взрослых и старых животных по сравнению с их исходной величиной.

Полученные данные указывают на то, что стресс сопровождается появлением метаболических сдвигов, направленных на ограничение чувствительности миокарда к инициации в нем цепных свободнорадикальных процессов. В основе их проявления среди прочих причин лежит уменьшение доли фосфолипидов с ненасыщенной структурой в фосфолипидном спектре сердца.

Количественные различия в уровне изменения соотношения  $\text{ФХ}/(\text{ФС} + \text{ФЕ})$  в гомогенатах сердца крыс исследуемых групп в условиях стимулированного ПОЛ свидетельствуют о существовании возрастных особенностей в реализации подобного адаптивного механизма. Они указывают на усиление эффективности ограничения инициации цепных свободнорадикальных процессов в миокарде за счет стрессорной модуляции насыщенности фосфолипидов мембран кардиомиоцитов при старении.

### Список использованной литературы

1. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 282 с.
2. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 270 с.
3. Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
4. Микаэлян Е. Н., Муртчан С. Л., Мелик-Азаева Е. А., Мкртчян В. Г. Перекисное окисление липидов и содержание антиоксидантов при иммобилизационном стрессе // Журн. exper. и клин. медицины. — 1983. — **23**, № 5. — С. 407–411.
5. Фролькис В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни. — Л.: Наука, 1988. — 239 с.
6. Davydov V. V., Shvets V. N. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. — 2003. — **38**, № 6. — P. 693–698.
7. Lopez-Luch G., Irusta P. M., Navas P., de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging // Exp. Gerontol. — 2008. — **43**, № 9. — P. 813–819.
8. Lowry O., Resebrought K. I., Farr A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**, № 1. — P. 265–275.
9. Martin I., Grotewiel M. S. Oxidative damage and age-related functional declines // Mech. Ageing Dev. — 2006. — **127**, № 5. — P. 411–423.

10. *Sahin E., Gumuslu S.* Immobilization stress in rat tissues: alteration of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* — 2007. — **144**, № 4. — P. 324–347.

Поступила 22.08.2013

**ФОСФОЛІПІДНА СТРУКТУРА МІОКАРДА  
ТА ЇЇ МОДУЛЯЦІЯ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ В УМОВАХ  
ІНДУКОВАНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ**

**В. М. Швець**

Запорізький державний медичний університет  
МОЗ України, 69091 Запоріжжя

У досліджах на дорослих (10–12 міс) і старих (22–25 міс) щурах визначали, а фосфоліпідний спектр гомогенатів серця, а також характер його модуляції при іммобілізаційному стресі та в умовах стимуляції індукованого перекисного окиснення ліпідів. Було встановлено, що стрес супроводжується формуванням метаболічних зрушень, спрямованих на обмеження чутливості міокарда до ініціації в ньому ланцюгових вільнорадикальних процесів. Показано, що в основі їх прояву лежить зменшення частки фосфоліпідів з ненасиченою структурою у фосфоліпідному спектрі серця. Більшою мірою подібний механізм обмеження ініціації ланцюгових вільнорадикальних процесів у міокарді проявляється у старих, ніж у дорослих тварин.

**PHOSPHOLIPID STRUCTURE OF THE MYOCARDIUM  
AND ITS MODULATION IN ADULT AND OLD RATS  
IN INDUCED LIPID PEROXIDATION**

**V. M. Shvets**

Zaporizhzhia State Medical University Ministry of Health  
Ukraine, 69091 Zaporizhzhia

The phospholipid spectrum of heart homogenates of adult and old rats as well as the pattern of its modulation in immobilization stress and in stimulation-induced lipid peroxidation were studied in experiments on adult (10–12 mo.) and old (22–25 mo.) rats. Stress was found to be accompanied by the formation of metabolic shifts aimed at limiting sensitivity of the myocardium to initiate the chain of free radical processes in it. A decrease in the share of unsaturated phospholipids in the phospholipid structure of the spectrum of heart was shown to underlie these manifestations. Such mechanism of limitation of initiation of the free radical chain processes in the myocardium was more significant in older vs. adult animals.

**Сведения об авторе**

В. Н. Швець — доцент кафедри біохімії и лабораторної діагностики, д.м.н.  
(talazap@i.ua)