

УДК 613.2+615.874.2

М.К. Мурзахметова*, Р.С. Утегалиева, В.К. Турмухамбетова,
А.Н. Аралбаева, А.К. Кайынбаева, Ж.Ж. Турумбетова

Институт физиологии человека и животных КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: mairamur@mail.ru

Резистентность мембран эритроцитов и биохимические показатели крови крыс в разные возрастные периоды

Исследовали возрастные изменения резистентности мембран эритроцитов и биохимические показатели крови крыс. Показано, что молодой организм наиболее чувствителен к окислительному стрессу, ведущему к нарушению целостности мембран клеток, тогда как мембраны эритроцитов взрослых животных отличались высокой устойчивостью. При старении снижается резистентность мембран эритроцитов и изменяются показатели биохимических параметров сыворотки крови, повышается уровень глюкозы, холестерина, креатинина и мочевой кислоты, что, вероятно, связано с нарушением обмена веществ организма.

Ключевые слова: эритроциты, осмотический гемолиз эритроцитов, перекисный гемолиз эритроцитов, мембрана, антиоксиданты, свободные радикалы, резистентность, пероксидация.

М.К. Мырзахметова, Р.С. Өтегалиева, В.К. Турмухамбетова,
А.Н. Аралбаева, А.К. Кайынбаева, Ж.Ж. Турумбетова

Әр түрлі жастағы егеуқұйрықтардың эритроцит мембраналарының резистенттілігі мен қанның биохимиялық көрсеткіштері

Жас ерекшелігіне байланысты егеуқұйрық эритроцит мембраналарының өткізгіштігі, осмотық, асқын тотығу гемолизі және қанның биохимиялық көрсеткіштері зерттелді. Жас ағза мембрана тұтастығының бұзылуына әкелетін тотығу стрессіне сезімтал болса, ал ересек жануарлардың эритроциттері жоғары оған жоғары төзімділік көрсетті. Кәрі егеуқұйрықтардың эритроцит мембраналарының резистенттілігі төмендеп, биохимия параметрлерінің көрсеткіштерінде өзгерістер анықталды. Глюкоза, холестерин, зәр қышқылының деңгейі артты.

Түйін сөздер: эритроциттер, осмотық гемолиз, асқын тотығу гемолизі, мембрана, антиоксиданттар, бос радикалдар, резистенттілік, пероксидация.

M.K. Murzahmetova, R.S. Utegaliyeva, V.K. Turmukhambetova,
A.N. Aralbayeva, A.K. Kaiynbaeva, Zh.Zh. Turumbetova

Resistance of erythrocyte membranes and blood biochemical parameters of rats in different age periods

Age changes of erythrocyte membranes' resistance and biochemical parameters of blood of rats were researched. It is shown, that the young organism is most sensitive to the oxidative stress leading to the damaging of integrity of cell membranes whereas erythrocyte membranes of adult animals differed high stability. At ageing take place the decreasing of resistency of erythrocyte membranes and changing of biochemical parameters of blood.

Key words: erythrocytes, osmotic hemolysis, peroxide hemolyses, a membrane, antioxidants, free radicals, resistency, peroxidation

Старение – это биологический процесс постепенного накопления изменений в органах и тканях организма, которые содействуют возрастающей возможности болезни и смерти и приводит к потере функций и резистентности организма к стрессу. Все живые молекулы подвергаются

разрушительному действию старения, но первичные механизмы этой непреклонной эволюции до сих пор неизвестны. Одной из наиболее известных теорий старения является свободно-радикальная гипотеза, которая предполагает, что старение – это результат неполной защиты

организма от повреждения тканей, вызванного свободными радикалами [1]. Процессы старения характеризуются гетерохронностью (разное время появления признаков старения в различных тканях, органах и системах), гетерокинетичностью (разная скорость развития в тканях различных возрастных изменений) и гетеротопностью (неодинаковая выраженность процессов старения в разных органах и тканях) [2]. Биологическое старение связано с увеличением клеточного уровня активных форм кислорода, а также образованием и накоплением окисленных биомолекул [3,4]. Свободным радикалам кислорода и свободнорадикальным окислительным реакциям отводят существенную роль в повреждении белков и липидов, образовании богатых продуктами ПОЛ “пигментов старения”, атерогенезе, в патологии старения различных органов [5,6]. Свободные радикалы кислорода рассматриваются как важные факторы, включающиеся в феномен биологического старения. Они могут повредить внутриклеточные компоненты такие, как ДНК, белки, и мембранные липиды которые могут привести к мутагенезу, ингибированию роста и клеточной смерти, и далее вовлечены в старение [7]. Мембраны являются одной из важных составляющих живой клетки, обеспечивающей нормальное функционирование ее компонентов, и поэтому понимание механизмов изменений в структуре мембран в процессе постнатального онтогенеза позволяет разработать методы повышения ее резистентности к различным негативным воздействиям, в том числе факторам, которые способны инициировать и ускорять старение клетки.

Целью работы было исследовать возрастные изменения резистентности мембран эритроцитов и биохимических показателей сыворотки крови крыс разного возраста.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены в условиях *in vivo* на 60 крысах месячного, 40 крысах 6-и месячного и 30 крысах 24-месячного возраста. Животные были разделены на 3 группы: 1 – молодые (1 мес.), 2 – взрослые (6 мес.) и 3 – старые (24 мес.).

Эритроциты получали, центрифугируя кровь 10 мин при 1000g. Плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали средой, содержащей 150 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄ (pH-7,4).

Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) определяли, инкубируя кровь в течение 20 мин при 37°C, в гипотонических растворах хлористого натрия (0,35-0,5 г/100мл). Эритроциты осаждали центрифугированием и в супернатанте измеряли концентрацию гемоглобина. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 540 нм. Уровень гемолиза клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу, вызванному раствором Na₂CO₃ в концентрации 0,1г/100мл.

Переокисную резистентность эритроцитов (ПГЭ) определяли по методу [4] в нашей модификации [5].

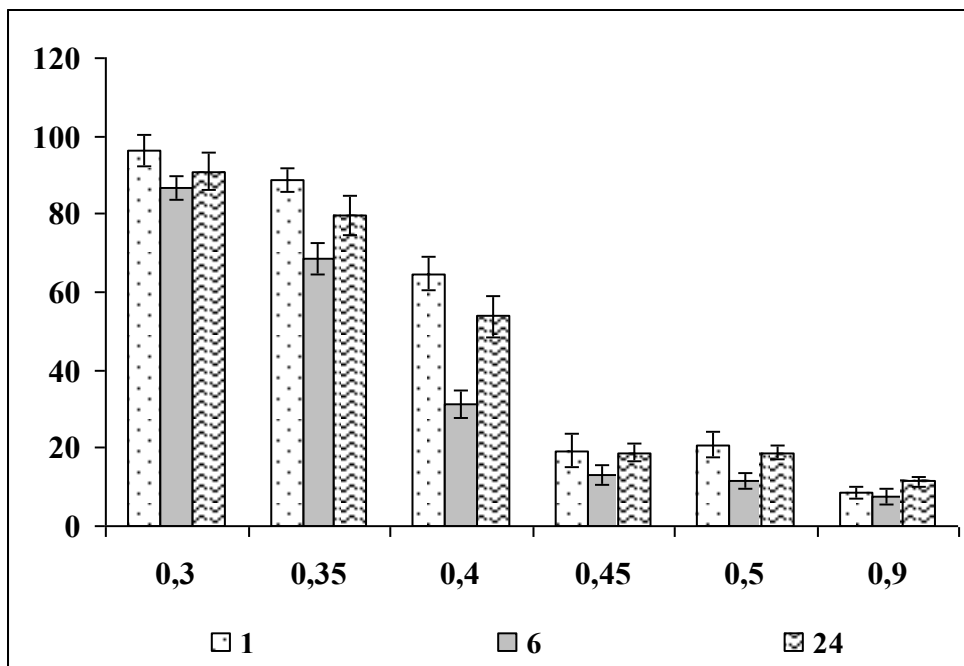
Проницаемость эритроцитарных мембран (ПЭМ) определяли по методу [6].

Определение биохимических показателей крови проводили на анализаторе Biochem SA, HTI, США.

Результаты исследований и их обсуждение

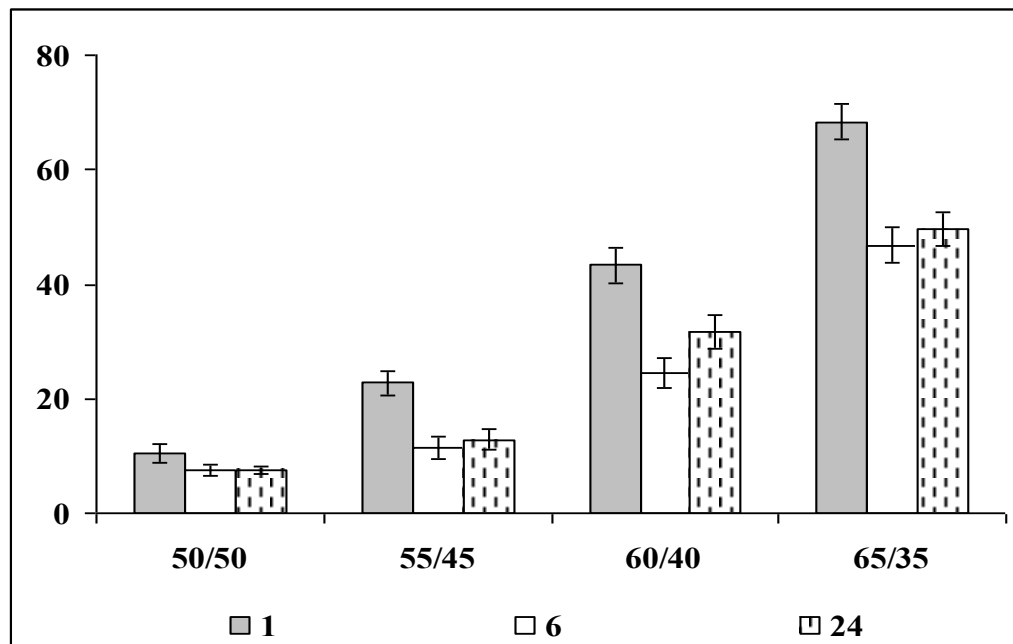
Исследование осмотической резистентности эритроцитов животных показало, что красные клетки крови месячных крысят более подвержены гемолизу в гипотонических растворах NaCl по сравнению с взрослыми и старыми особями. Следует отметить, что осмотическая резистентность эритроцитов 24-месячных крыс ниже относительно показателей 2-й группы (рисунок 1). Таким образом, результаты исследований выявили, что эритроциты взрослых животных более устойчивы к гемолизирующему действию гипотонических растворов NaCl по сравнению с молодыми и старыми животными.

Известно, что одно из важнейших свойств мембраны - ее избирательная проницаемость для различных веществ. Ввиду уникальной структуры своей мембраны клетки обеспечивают постоянство внутренней среды, что, несомненно, дает возможность для нормального функционирования органелл. Следовательно, повреждение структуры мембран приводит к изменению ее проницаемости, к функциональному сбою в работе внутриклеточных органоидов и клетки, а в дальнейшем к нарушению деятельности клетки. Результаты экспериментов, по изучению изменения проницаемости эритроцитарных мембран у животных различных возрастных групп, представлены на рисунке 2. При увеличении концентрации мочевины и уменьшении концентрации NaCl наблюдалось повышение степени гемолиза. Нужно отметить, что, как и в предыдущем



По оси абсцисс: концентрация раствора NaCl, %; по оси ординат: степень гемолиза, %. 1, 6, 24 –возраст экспериментальных животных (месяцы)

Рисунок 1 - Осмотическая резистентность эритроцитов крыс различного возраста



По оси абсцисс: концентрации растворов мочевины/NaCl; по оси ординат: величина гемолиза, % (p<0,001).1, 6, 24 –возраст экспериментальных животных (месяцы)

Рисунок 2 – Проницаемость эритроцитарных мембран животных в разные возрастные периоды

эксперименте, эритроцитарные мембраны крыс инфантильного возраста оказались менее устойчивыми к действию высоких концентраций мочевины.

Как было сказано ранее, важнейшим механизмом повреждения мембран является свободнорадикальное окисление молекул, входящих в состав билипидного слоя. Основные инициаторы перекисного окисления – это активные формы кислорода, которые образуются при действии различных факторов. Задачей следующей серии экспериментов являлось исследование резистентности мембран эритроцитов подопытных животных к перекисному гемолизу (рисунок 3).

Резистентность эритроцитарных мембран к перекисному гемолизу отображает состояние мембранных структур. При действии на суспензию эритроцитов 3% раствора перекиси водорода происходит разрыв мембран и выход гемоглобина в среду инкубации вследствие ее повреждения H_2O_2 , которая является одной из форм АФК. На рисунке 3 видно, что степень гемолиза эритроцитов 1-месячных животных составила 87,1%, 6-месячных крыс-68,3%, 24-месячных – 75,3%.

Результаты исследования биохимических параметров крови крыс в различные возрастные периоды представлены в таблице 1. Из таблицы видно, что с возрастом меняются все биохимические параметры крови. По мере старения животных отмечена тенденция к повышению таких показателей как уровень глюкозы, холестерина, креатинина и мочевой кислоты, что связано с нарушением обмена веществ в организме.

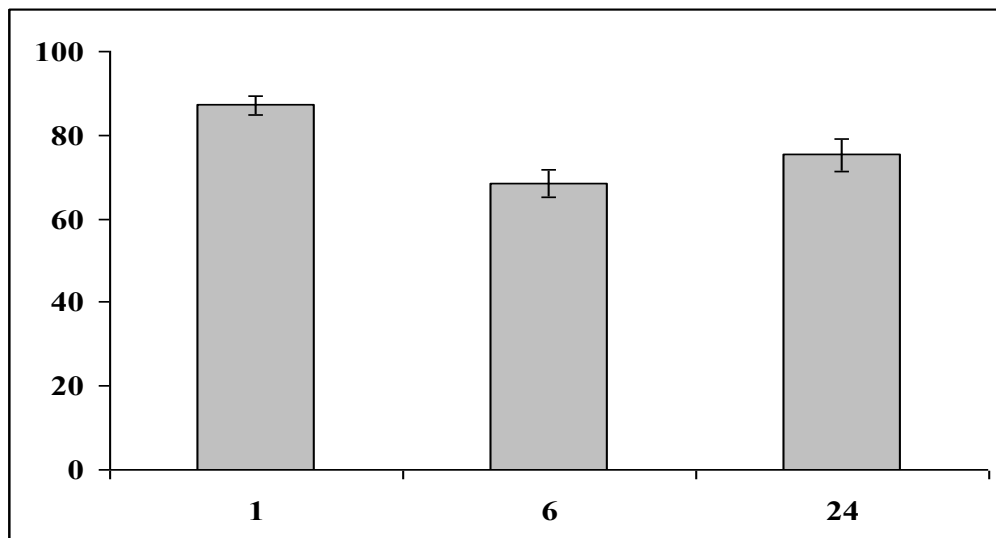
Согласно нашим данным у месячных крыс уровень показателей глюкозы, холестерина и креатинина в сыворотке крови существенно не отличался от таковых значений половозрелых крыс. Известно, что вследствие повреждения почечных сосудов развивается нефропатия. Причиной поражения сосудистой системы почек является повышенное артериальное давление, гипергликемия и т.д. В этих условиях почки уже не могут в должной мере выполнять функцию фильтрации. С возрастом повышается уровень мочевой кислоты и креатинина, характеризующий функцию почек. Содержание общего белка у молодых крысят ниже на 50% по сравнению с половозрелыми животными, тогда как у старых крыс отмечена тенденция к повышению данного

параметра. Активность трансаминаз, содержание билирубина и щелочной фосфатазы – показатели характеризующие состояние печеночных клеток. Из таблицы 1 видно, что уровень АлАт у старых крыс несколько снижен по сравнению с остальными двумя группами, вероятнее всего вследствие уменьшения количества клеток синтезирующих фермент.

У молодых крыс содержание АсАт в сыворотке превышает показатели фермента у взрослых крыс в 1,3 раза, у старых животных отмечено незначительное повышение значения АсАт. Известно, что аспаратаминотрансфераза представляет собой фермент, который необходим для синтеза из щавелевоуксусной кислоты аспарагиновой кислоты. АсАт локализуется в цитозоле и в митохондриях клеток различных органов. По количественному содержанию АсАт в органах, на первом месте находится сердечная мышца, затем идут в порядке убывания печень, скелетные мышцы, почки, мозг, поджелудочная железа, селезенка и легкие. Нормальный уровень АсАт в крови колеблется в определенных пределах и различен для разных возрастных групп. Для новорожденных и детей характерна более высокая активность фермента, в связи с усиленным обменом веществ. Повышение активности АсАт у старых крыс вероятно связано с нарушением функции печени по мере старения.

Исследование ЩФ и общего билирубина в сыворотке крови показало, что у 1-месячных крысят и 24-месячных животных названные показатели превышают таковые половозрелых крыс. Щелочная фосфатаза содержится во всех тканях, гидролизует различные эфиры с фосфорной кислотой (нуклеотиды и др.) и напрямую связана с клеточными мембранами. Известно около 11 изоферментов щелочной фосфатазы. Основными изоферментами являются печеночные (45-55%) и костные (43-53%). Количество ЩФ может увеличиться у растущего организма из-за увеличения количества костного изофермента, а при старении-из-за увеличенной активности печеночного изофермента.

Таким образом, результаты экспериментов по исследованию резистентности эритроцитарных мембран выявили, что молодой организм наиболее чувствителен к окислительному стрессу, ведущему к нарушению целостности мембран клеток, тогда как клетки зрелых животных отличались высокой устойчивостью к повреж-



По оси абсцисс: 1, 6, 24-возраст животных (месяцы); по оси ординат: величина гемолиза, % ($p \leq 0,001$).

Рисунок 3 – Исследование перекисного гемолиза эритроцитов у крыс в различные возрастные периоды

Таблица 1 - Биохимические параметры сыворотки крови экспериментальных животных

Показатели	Возраст животных		
	1-месячные	6-месячные	24-месячные
Глюкоза, ммоль/л	3,2±1,5	3,3±1,2	5,6±0,11
Общий белок, г/л	36,6±0,12	52,0±2,16	56,5±2,22
Холестерин, ммоль/л	1,34±0,68	0,74±0,11	1,47±0,05
АСТ, У/л	96,1±2,0	80,4±1,14	73,7±2,89
АЛТ, У/л	39,9±4,3	37,7±0,9	30,8±0,45
Щелочная фосфатаза, У/л	248,9±0,75	136,2±2,12	269,2±4,48
Билирубин, мкмоль/л	143,0±3,11	51,8±2,43	78,9±2,23
Креатинин, мкмоль/л	50,2±2,14	53±1,58	89,9±3,31
Мочевая кислота, ммоль/л	42,3±1,6	62,2±2,67	76,7±2,55

дающим факторам. При старении наблюдалось снижение резистентности мембран клеток. Высокие значения уровня общего билирубина у молодых крысят, по-видимому, обусловлены тем, что повышению билирубина в крови способствует низкое содержание альбумина в крови, который необходим для усвоения непрямого

билирубина печенью. Печень, а также ферменты, участвующие в переходе непрямого билирубина в прямой билирубин, недостаточно развиты в детском организме, тогда как повышенное содержание пигмента в крови старых животных можно объяснить развитием холестатических процессов.

Литература

- 1 Harman D. Free radical theory of aging: An update // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol.1067, – P. 1–12.
- 2 Kuka S., Tatarkova Z., Kaplan P. Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. // *Acta Medica Martiniana*. – 2013. – Vol. 12, N1, P.-11.
- 3 Poljsak B., Suput D., Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants // *J. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.- 2013.- Vol.46, Article ID 956792, 11 p.
- 4 Михалкина Н.И Мурзахметова М. К. Структурно-функциональные перестройки клеточных мембран в норме и при стрессовых состояниях (обзор) // *Вестник КазНУ им. Аль-Фараби, серия экологическая*. 2002. №2(11).- С.40-45.
- 5 Goncharova N.D., Marenin V.Y., Bogatyrenko T.N. Stress, aging and reliability of antioxidant enzyme defense // *Curr Aging Sci*. – 2008. – Vol.1, N1. P.22-29.
- 6 Singh K., Kaur S., Kumari K., Singh G. and Kaur A. Alterations in Lipid Peroxidation and Certain Antioxidant Enzymes in Different Age Groups under Physiological Conditions // *J. Hum. Ecol*, 2009. – Vol.27, N2. – P.143-147.
- 7 Valko M., Leibfritz D., Moncola J. e.a. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2007. – Vol. 39, – P.44–84.
- 8 Покровский А.А., Абрарова А.А. К вопросу перекисной резистентности эритроцитов // *Вопр. Питания*. – 1964. №16. – С.44-49.
- 9 Мурзахметова М.К., Утегалиева Р.С., Мирошина Т.Н., Шайхынбекова Р.М., Михалкина Н.И. Корректирующее влияние индоламинов на состояние мембран эритроцитов при действии ионов кадмия // *Вестник КазНУ. Сер.биол.* – 2002. – №3. – С.80-86.
- 10 Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени // *Терапевтический архив*. – 1982. – Т.54, № 2. – С.59-62.

Reference

- 1 Harman D. Free radical theory of aging: An update // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol.1067, – P. 1–12.
- 2 Kuka S., Tatarkova Z., Kaplan P. Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. // *Acta Medica Martiniana*. – 2013. – Vol. 12, N1, P.-11.
- 3 Poljsak B., Suput D., Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants // *J. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.- 2013.- Vol.46, Article ID 956792, 11 p.
- 4 Mihalkina N.I., Murzahmetova M.K. Strukturno-funkcionolnye perestroiki kletochnyh membrane v norme i pri stressovyh sostoianiah (obzor) // *Vestnik KazNU im. Al-Pharabi, seria ecologisheskaia*. 2002. №2(11).-S.40-45.
- 5 Goncharova N.D., Marenin V.Y., Bogatyrenko T.N. Stress, aging and reliability of antioxidant enzyme defense // *Curr Aging Sci*. – 2008. – Vol.1, N1. P.22-29.
- 6 Singh K., Kaur S., Kumari K., Singh G. and Kaur A. Alterations in Lipid Peroxidation and Certain Antioxidant Enzymes in Different Age Groups under Physiological Conditions // *J. Hum. Ecol*, 2009. – Vol.27, N2. – P.143-147.
- 7 Valko M., Leibfritz D., Moncola J. e.a. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2007. – Vol. 39, – P.44–84.
- 8 Pokrovskii A.A., Abrarova A.A. K voprosu perekisnoi rezistentnosti eritrocitov // *Vopr. Pitaniya*. – 1964. №16. – S.44-49.
- 9 Murzahmetova M.K., Utegalieva R.S., Miroshina T.N., Shaihynekova R.M., Mihalkina N.I. Korregiruyushee vliyanie indolaminov na sostoyanie membrane eritrocitov pri deistvii ionov kadmiya // *Vestnik KazNU. Ser.biol.* – 2002. – №3. – S.80-86.
- 10 Kolmakov V.N., Radchenko V.G. Znachenie opredeleniya pronicaemosti eritrocitarnyh membrane (PEM) v diagnostike hronicheskikh zabjlevanii pečeni // *Terapevticheskii arhiv*. – 1982. – Т.54, №2. –S.59-62.