

УДК 616.12-008.46:611.018.63]-092.9
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-51-56>

Активность дыхания изолированных кардиомиоцитов и микровязкость их мембран у крыс разных возрастов при сердечной недостаточности

Корепанов В.А.¹, Реброва Т.Ю.¹, Афанасьев С.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

РЕЗЮМЕ

Актуальность. По последним эпидемиологическим данным, сердечная недостаточность (СН) диагностирована у 10% взрослого населения старше 70 лет, при этом все чаще данный диагноз ставят лицам молодого и среднего возраста. В основе патогенеза СН может лежать снижение дыхания в кардиомиоцитах с возрастом, что отражается на работе энергозависимых процессов в клетках.

Цель. Изучить дыхательную активность и микровязкость мембран кардиомиоцитов (КМ) крыс в возрасте 2 и 15 мес при сердечной недостаточности.

Материалы и методы. Исследование проведено на самцах крыс линии Wistar. Сформировано четыре группы животных: две группы интактных крыс в возрасте 2 и 15 мес ($n = 12$) и две группы животных аналогичных возрастов ($n = 10$), у которых моделировали развитие СН, формировавшуюся к 28-м сут после двукратного подкожного введения изадрина гидрохлорида в дозе 170 мг/кг с интервалом 24 ч. Изолированные кардиомиоциты получали из промытого ферментами сердца. Изучение активности дыхания клеток проводили в термостатируемой камере в инкубационной среде с добавлением субстратов фосфорилирования (АДФ) и окисления (сукцинат). Рассчитывали коэффициент дыхательного контроля (ДК) как отношение скоростей убыли кислорода в метаболических состояниях V3 и V4. Микровязкостные характеристики мембран оценивали по коэффициенту эксимеризации флуоресцентного зонда пирен в зонах белок-липидных и липид-липидных контактов.

Результаты. Дыхательный контроль в КМ интактных животных с возрастом не претерпевал изменений. При СН у 2-месячных крыс ДК не изменялся относительно интактного возрастного контроля. У 15-месячных крыс с СН происходит значимое снижение ДК в КМ как относительно интактных животных этого возраста, так и относительно 2-месячных крыс с СН. Отмечено возраст-зависимое снижение микровязкости мембран КМ в зонах липид-липидных взаимодействий без значимых изменений показателя в местах белок-липидных контактов. При СН у 2-месячных животных микровязкость мембран КМ в зонах белок-липидных взаимодействий существенно понижается, а у 15-месячных повышается относительно интактного контроля в группе. Межгрупповое сравнение выявило возраст-зависимое увеличение микровязкости мембран КМ в области белок-липидных контактов и отсутствие различий в фазе общих липидов.

Заключение. Выявлено отсутствие значимых изменений дыхания с возрастом у интактных крыс. При СН у 15-месячных животных дыхание КМ значительно ниже интактного контроля и 2-месячных животных с СН. Данные изменения могут быть обусловлены различием микровязкостных характеристик мембран клеток в разные периоды онтогенеза.

Ключевые слова: дыхание кардиомиоцитов, микровязкость мембран, возраст-зависимые изменения, крысы

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Корепанов Вячеслав Андреевич, e-mail: vakorep41811@gmail.com

Источники финансирования. Исследование проведено в рамках темы фундаментальных научных исследований НИИ кардиологии Томского НИМЦ (№ АААА-А15-115123110026-3).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 192 от 18.12.2019).

Для цитирования: Корепанов В.А., Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А. Активность дыхания изолированных кардиомиоцитов и микровязкость их мембран у крыс разных возрастов при сердечной недостаточности. *Бюллетень сибирской медицины.* 2023;22(1):51–56. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-51-56>.

Respiration in isolated cardiomyocytes and microviscosity of their membranes in rats of different ages with heart failure

Korepanov V.A.¹, Rebrova T.Yu.¹, Afanasiev S.A.¹

¹ *Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMС), Russian Academy of Sciences (RAS) 111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation*

ABSTRACT

Background. According to the latest epidemiological data, heart failure (HF) is diagnosed in 10% of adult population over 70 years old. However, currently this diagnosis is being increasingly made in young and middle-aged people. The pathogenesis of HF may be based on a decrease in respiration in cardiomyocytes with age, which affects the function of energy-dependent processes in cells.

Aim. To study respiration in cardiomyocytes and microviscosity of their membranes in rats aged 2 and 15 months with heart failure.

Materials and methods. The study was carried out on male Wistar rats. The animals were divided into 4 groups: 2 groups of intact rats aged 2 and 15 months ($n = 12$) and 2 groups of animals of similar ages ($n = 10$) with a model of HF. In the latter, HF formed by day 28 after a double subcutaneous injection of isoproterenol hydrochloride at a dose of 170 mg / kg with an interval of 24 hours. Isolated cardiomyocytes were obtained from enzyme-washed rat hearts. Cell respiration was studied in a thermostated chamber in an incubation medium supplemented with phosphorylation (ADP) and oxidation (succinate) substrates. The respiratory control (RC) ratio was calculated by dividing V3 respiration state to V4. Membrane microviscosity characteristics were assessed by the eximerization coefficient of pyrene fluorescence in the areas of protein – lipid and lipid – lipid interactions.

Results. RC in cardiomyocyte membranes of intact animals did not change with age. In 2-month-old rats with HF, respiratory control ratio (RCR) did not change compared with the intact age-matched controls. In 15-month-old rats with HF, there was a significant decrease in RC of cardiomyocytes (CM) compared with the intact animals of this age and 2-month-old rats with HF. An age-dependent decrease in the microviscosity of CM membranes in the areas of lipid – lipid interactions and no significant changes in the parameter at the sites of protein – lipid interactions were noted. In 2-month-old animals with HF, the microviscosity of CM membranes in the areas of protein – lipid interactions significantly decreased, and in 15-month-old rats it increased, compared with the intact controls. When carrying out an intergroup comparison, an age-dependent increase in the microviscosity of CM membranes in the areas of protein – lipid interactions and no differences in the parameter in the areas of lipid – lipid interactions were revealed.

Conclusion. In the intact rats, the absence of significant changes in respiration with age was revealed. In the 15-month-old animals with HF, respiration in CM was significantly lower than in the intact controls and 2-month-old animals with HF. These changes may be due to the differences in the membrane microviscosity characteristics in different periods of ontogenesis.

Keywords: cardiomyocyte respiration, membrane microviscosity, age-dependent changes, rats

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The research was carried out within the fundamental research topic of the Cardiology Research Institute, Tomsk NRMС (No. АААА-А15-115123110026-3).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Bioethics Committee at the Cardiology Research Institute, Tomsk NRMС (Protocol No. 192 of 18.12.2019).

For citation: Korepanov V.A., Rebrova T.Yu., Afanasiev S.A. Respiration in isolated cardiomyocytes and microviscosity of their membranes in rats of different ages with heart failure. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(1):51–56. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-51-56>.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечная недостаточность (СН) является частым исходом большинства заболеваний сердечно-сосудистой системы. По данным эпидемиологических исследований, с возрастом частота встречаемости СН увеличивается с 3% в возрастной группе 46–64 лет до 10% в возрастной группе 70 лет и старше [1]. В последнее время прослеживается тренд омоложения данной патологии: результаты европейских исследований показали увеличение процента пациентов моложе 50 лет с впервые диагностированной СН [2, 3]. Одним из возможных патогенетических факторов развития СН является снижение на поздних этапах онтогенеза активности дыхательных процессов в кардиомиоцитах (КМ) [4]. Известно, что состояние липидного бислоя биологических мембран отражается на их функционировании, а также влияет на работу мембран-ассоциированных ферментов [5].

Целью проведенного исследования стало сравнительное исследование активности дыхательных процессов и микровязкостных характеристик мембран кардиомиоцитов при сердечной недостаточности у крыс разных возрастных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на самцах белых крыс линии Wistar. Сформировано четыре группы животных: две группы интактных крыс в возрасте 2 и 15 мес ($n = 12$) и две группы животных аналогичных возрастов ($n = 10$), у которых моделировали развитие СН. В работе использовали изадриновую модель сердечной недостаточности. Инъекции раствора изопротеренола гидрохлорида (Isadrin, Sigma, США) выполняли двукратно подкожно с интервалом 24 ч (170 мг/кг массы крысы). СН развивалась к 28-м сут после второй инъекции [6]. К моменту формирования групп масса двухмесячных и пятнадцатимесячных крыс составила в среднем, соответственно, 199 (198; 203) и 528 (500; 563) г. Все манипуляции над крысами осуществляли на основании положения приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 1 99н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Исследование проведено в рамках темы № ААА-

А-А15-115123110026-3 фундаментальных научных исследований НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 192 от 18.12.2019).

Кардиомиоциты выделяли из изолированного сердца. Наркотизированной крысе производили торакаотомию, получая доступ к сердцу. Иссеченное сердце переносили в ледяной раствор Кребса – Ханзеляйта (в мМ) (NaCl – 118; KCl – 4,7; KH_2PO_4 – 1,25; MgSO_4 – 1,3; CaCl_2 – 1,2; глюкоза – 10) (pH = 7,35–7,40) (Sigma, США), удаляли соединительную ткань, выделяли аорту и отмывали орган от крови. Затем его переносили в перфузионную камеру и через аорту перфузировали оксигенированными (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) растворами Кребса – Ханзеляйта с различным содержанием ионов Ca^{2+} и протеолитическими ферментами (коллагеназа II типа (ПанЭко, Россия) – 0,2 мг/мл и проназа (Roche Diagnostics, США) – 0,1 мг/мл). По окончании процедуры перфузии промытое ферментами сердце помещали в раствор Кребса – Ханзеляйта, удаляли восходящий отдел аорты и измельчали до фрагментов размерами 1–2 мм³. Затем мягким пипетированием получали суспензию изолированных кардиомиоцитов [4].

Определение концентрации общего белка в полученной суспензии клеток проводили методом микро-Лоури набором реактивов фирмы Sigma (США). Оптическую плотность в исследованных пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop (США) против холостой пробы при $\lambda = 630$ нм.

Измерения дыхательной активности кардиомиоцитов проводили на анализаторе жидкостей «Эксперт 001» (Эконикс, Россия) с использованием датчика Кларка ДКТП – 02.4 непосредственно сразу после выделения. Аликвоту суспензии клеток (содержание белка 0,5–1 мг) вносили в термостатируемую камеру ($t = 25$ – 27 °С) объемом 1 мл с предварительно оксигенированной средой инкубации (в мМ) (сахароза – 0,25; KCl – 10; KH_2PO_4 – 5; MgCl_2 – 1,2; янтарная кислота – 5). Показание концентрации кислорода в среде после стабилизации и «согревания» кардиомиоцитов соответствовали метаболическому состоянию V2 – свободное дыхание (достаточное количество кислорода, субстрата окисления в среде, но отсутствие субстрата фосфорилирования – АДФ).

Далее производили измерение скорости убывли кислорода в среде после добавления в нее 100 мкл 0,2 мМ раствора АДФ – метаболическое состояние V3, и после его израсходования (метаболическое состояние V4). Потребление кислорода КМ рассчитывали в нМ O₂/мин/мг белка в пробе. Коэффициент дыхательного контроля (ДК) вычисляли как отношение скоростей потребления кислорода в метаболических состояниях V3 и V4 [4].

Микровязкость мембран КМ изучали методом оценки латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирен и вычисления коэффициентов его эксимеризации (K_Е) $K_E = I_{470}/I_{390}$ при длинах волн возбуждения 340 и 285 нм для липид-липидных и белок-липидных контактов соответственно [7]. Интенсивность образования димеров пирена, характеризующаяся значениями K_Е, находится в обратной зависимости от микровязкости мембран. Максимум свечения регистрировали при длине волны 390 нм для мономеров зонда, 470 нм – для димеров (эксимеров) зонда. Флуоресценцию флуорофора измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США).

Анализ полученного массива данных проводили в пакете статистических программ Statistica 10.0. Проверка соответствия распределения количественных данных нормальному закону производилась тестом Шапиро – Уилка. Сравнение независимых групп количественных данных, распределение которых отлично от нормального, проводили непараметрическим тестом Манна – Уитни. Результаты приведены в виде медианы и межквартильного интервала Me (Q₁; Q₃). Статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты, полученные при оценке дыхательной активности КМ рассматриваемых групп животных. Видно, что по коэффициенту ДК группы интактных 2- и 15-месячных животных не имели значимых различий ($p = 0,05$). Величина этого показателя составляла у двухмесячных крыс 3,57 (3,32; 3,93), а у пятнадцатимесячных особей – 3,36 (3,27; 3,40).

На фоне развившейся СН рассматриваемые группы животных статистически значимо ($p < 0,01$) различались по величине коэффициента ДК. При этом оказалось, что у 2-месячных животных этот показатель остался практически без изменения – 3,50 (3,19; 4,34) ($p = 0,86$). Напротив, у 15-месячных животных при СН величина коэффициента ДК была значимо ниже интактных значений своей

возрастной группы и составляла только 2,77 (2,71; 2,78) ($p < 0,05$) (рис. 1).

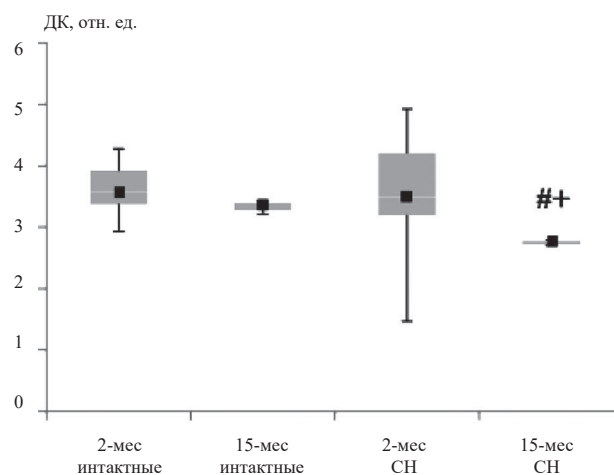


Рис. 1. Коэффициент дыхательного контроля (отн. ед.) кардиомиоцитов крыс; Me (Q₁; Q₃). ДК – дыхательный контроль; СН – сердечная недостаточность. Значимые различия: # между возрастными группами животных с СН $p < 0,01$; + между интактными и опытными животными в возрастной группе $p < 0,05$

При сопоставлении K_Е зонда пирен в зонах белок-липидных контактов мембран кардиомиоцитов интактных животных не было выявлено значимых ($p = 0,11$) возраст-зависимых различий (рис. 2). Однако при сравнении коэффициентов микровязкости мембран в зонах липид-липидных контактов была установлена его явная возрастная зависимость (рис. 3). В нашем исследовании величина данного коэффициента у 2-месячных особей составила 1,25 (1,01; 1,48), а у 15-месячных – 1,73 (1,37; 1,87) ($p < 0,001$).

При сравнении K_Е пирена в областях белок-липидных взаимодействий мембран клеток сердечной мышцы животных с СН наблюдается значимое возраст-зависимое снижение данного показателя ($p < 0,05$). При этом у 2-месячных крыс на фоне СН данный показатель, в сравнении с интактными особями, существенно больше и составляет 1,21 (1,06; 1,54) ($p < 0,01$). Напротив, у 15-месячных животных на фоне СН этот коэффициент оказался статистически значимо более низким – 0,88 (0,70; 0,90) ($p < 0,05$) (рис. 2). В зонах липидных контактов значимых различий коэффициентов микровязкости между интактными и опытными животными в обеих возрастных группах не выявлено. Также не установлено статистически значимой разницы данных коэффициентов между возрастными группами как в подгруппе интактных крыс, так и особей с модельной СН (см. рис. 3).

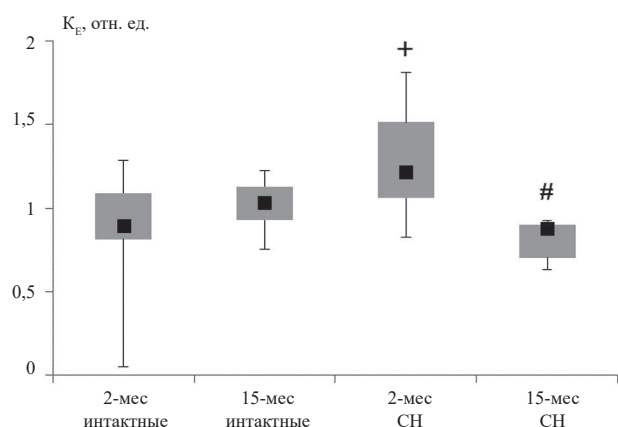


Рис. 2. Коэффициент эксимеризации мембран кардиомиоцитов в зонах белок-липидных контактов, отн. ед., M_e (Q_1 ; Q_3): K_E – коэффициент эксимеризации зонда пирен; СН – сердечная недостаточность (здесь и на рис. 3); # значимые различия между возрастными группами животных с СН, $p < 0,05$; + значимые различия между интактными и опытными животными в возрастной группе, $p < 0,01$

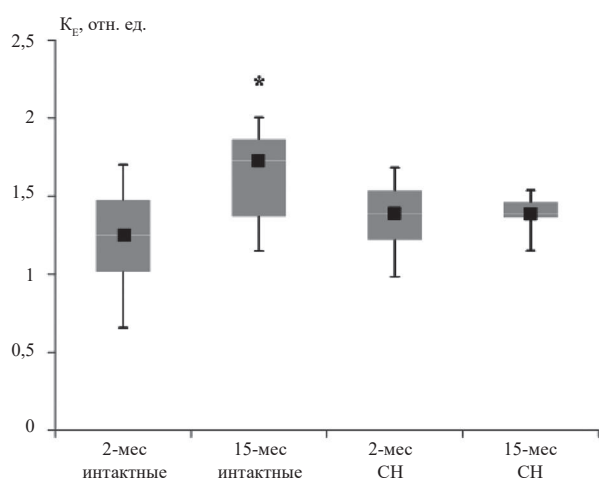


Рис. 3. Коэффициент эксимеризации мембранкардиомиоцитов в зонах липид-липидных контактов, отн. ед., M_e (Q_1 ; Q_3): * значимые различия между интактными группами 2- и 15-месячных животных, $p < 0,001$

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие значимых различий в дыхательной активности КМ между интактными животными обеих возрастных групп может быть обусловлено подключением адаптационных резервов КМ взрослых особей. При этом значения ДК в обеих группах попадают в пределы референсных значений нормы согласно литературным данным (3–5 отн. ед.) [8]. Стоит отметить, что на фоне СН у молодых животных не наблюдалось значимого изменения в ДК, что может говорить об их большем адаптационном резерве КМ. У взрослых крыс с СН данный показатель существенно снижался как относительно молодых особей с СН, так и относительно интактных особей

того же возраста, что, вполне вероятно, обусловлено срывом компенсаторно-приспособительных реакций клеток и снижением функции с возрастом. Также можно предположить, что при введении токсических доз изадрина в клетке в ответ на воздействие данного агента повышается синтез активных форм кислорода ввиду интенсификации процессов энергообразования и вероятного повышения утечки электронов из электрон-транспортной цепи. Это согласуется с результатами наших ранее проведенных исследований, показавших, что с возрастом снижается активность антиоксидантных ферментов в ткани миокарда [9].

Выдвинутое выше предположение об изменении компенсаторно-приспособительных резервов клеток миокарда вполне согласуется с данными, полученными при сравнительном анализе микровязкости мембран кардиомиоцитов тех же групп животных. Различия K_E в группах интактных животных разного возраста можно связать с возраст-зависимым изменением обмена холестерина. Одной из главных функций данного нейтрального липида является регуляция вязкости биологических мембран за счет изменения латеральной подвижности жирнокислотных остатков фосфолипидов [10]. С возрастом в организме уровень холестерина повышается [11], что может отражаться на его увеличении его содержания в пределах липидного бислоя мембран. Последнее ведет к увеличению вязкости мембран, что делает их жесткими.

Данные, полученные нами в группах животных с СН, могут говорить о разнонаправленных возраст-зависимых изменениях фосфолипидного состава аннулярных липидов, что отражается на показателях K_E . Такие различия могут отражаться на активности ферментных систем клеток, обеспечивающих энергетический обмен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлено, что дыхание изолированных КМ интактных животных не подвержено значимым возрастным изменениям, однако начинает проследиваться тренд к его снижению, что может говорить об истощении компенсаторных механизмов клетки по поддержанию его оптимального уровня. При развитии СН данные различия становятся более явными, что проявляется в значимом снижении активности дыхания у возрастных крыс (15 мес) относительно интактных животных той же возрастной группы. Одним из факторов, обуславливающих такие различия, могут выступать микровязкостные характеристики мембран кардиомиоцитов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Choi H., Park M., Youn J. Update on heart failure management and future directions. *Korean J. Intern. Med.* 2019;34(1):11–43. DOI: 10.3904/kjim.2018.428.
2. Barasa A., Schaufelberger M., Lappas G., Swedberg K., Dellborg M., Rosengren A. Heart failure in young adults: 20-year trends in hospitalization, aetiology, and case fatality in Sweden. *Eur. Heart J.* 2014;35(1):25–32. DOI: 10.1093/eurheartj/eh278.
3. Christiansen M., Kober L., Weeke P., Vasan R., Jeppesen J., Smith J. et al. Age-specific trends in incidence, mortality, and comorbidities of heart failure in Denmark, 1995 to 2012. *Circulation.* 2017;135(13):1214–1223. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025941.
4. Rebrova T.Y., Korepanov V.A., Afanasiev S.A. Age peculiarities of respiratory activity and membrane microviscosity of mitochondria from rat cardiomyocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;170(3):368–370. DOI: 10.1007/s10517-021-05069-8.
5. Casares D., Escribá P.V., Rosselló C.A. Membrane lipid composition: effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(9):2167. DOI: 10.3390/ijms20092167.
6. Teerlink J., Pfeffer J., Pfeffer M. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ. Res.* 1994;75(1):105–113. DOI: 10.1161/01.res.75.1.105.
7. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989:277.
8. Еремеев С.А., Ягужинский Л.С. О локальном сопряжении систем электронного транспорта и синтеза АТФ в митохондриях. *Биохимия.* 2015;80(5):682–688.
9. Rebrova T.Y., Afanasiev S.A. State of the antioxidant system and the severity of lipid- peroxidation processes in the myocardium and blood plasma of rats of different ages with postinfarction atherosclerosis. *Advances in Gerontology.* 2021;11(2):152–157. DOI: 10.1134/S2079057021020132.
10. Yang S., Kreutzberger A., Lee J. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids.* 2016;199(1):136–143. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003.
11. Yi S., Yi J., Ohrr H. Total cholesterol and all-cause mortality by sex and age: a prospective cohort study among 12.8 million adults. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1596. DOI: 10.1038/s41598-018-38461-y.

Информация об авторах

Корепанов Вячеслав Андреевич – аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, Россия, vakorep41811@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2818-1419>

Реброва Татьяна Юрьевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, rebrova@cardio-tomsk.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3667-9599>

Афанасьев Сергей Александрович – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, tursky@cardio-tomsk.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

✉ **Корепанов Вячеслав Андреевич**, e-mail: vakorep41811@gmail.com

Поступила в редакцию 08.09.2022;
одобрена после рецензирования 10.10.2022;
принята к публикации 11.10.2022