

А. И. Стародумова, Т. А. Веселова, С. А. Мысягин, А. П. Веселов

Акустическая интерферометрия эритроцитов крыс с алиментарной дислипидемией

Аннотация. Структурное ремоделирование эритроцитов в условиях гиперхолестеролемии может быть связано с накоплением холестерина в клеточной мембране, конечных продуктов липотоксического промежуточного метаболизма в клетках, что оказывает влияние на физико-химические характеристики эритроцитов и вязкость крови. Структурные перестройки эритроцитов отражают тяжесть патологии. Актуален поиск новых недорогих экспресс методов диагностики дислипидемий. Цель исследования — оценка акустическим методом упругости эритроцитов крыс с алиментарной дислипидемией и интактных животных. Материалом исследования служила цельная кровь, стабилизированная K_3EDTA , плазма и суспензия эритроцитов крыс с гиперхолестеролемией. Модель гиперлипидемии индуцировали у 10 беспородных крыс-самцов с массой тела 220–250 г атерогенным рационом. Упругость эритроцитов исследовали акустическим методом. Относительное содержание отдельных фракций липидов оценивали методом тонкослойной хроматографии. Определение эритроцитарных гематологических показателей производили на автоматическом анализаторе. В работе показано повышение упругости эритроцитов крыс с алиментарной дислипидемией в целом и поверхности красных клеток. Показатели упругости эритроцитов зависели от содержания холестерина в плазме крови крыс и относительного содержания холестерина в эритроцитах. Показана возможность использования акустической интерферометрии эритроцитов в комплексной диагностике атеросклероза.

Ключевые слова: гиперхолестеринемия, атеросклероз, упругость эритроцитов, ультразвуковая интерферометрия, диагностика.

Авторы:

Стародумова Александра Игоревна — аспирант Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского; e-mail: Starodumovasa@gmail.com;

Веселова Татьяна Анатольевна — кандидат биологических наук, доцент; e-mail: Veselova-TA@yandex.ru;

Мысягин Сергей Алексеевич — кандидат биологических наук, доцент; e-mail: Smysyagin@inbox.ru;

Веселов Александр Павлович — доктор биологических наук, профессор; e-mail: Veselov@ibbm.unn.ru.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»; 603950, Россия, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Введение. Структурное ремоделирование эритроцитов в условиях гиперхолестеролемии может быть связано с накоплением в клеточной мембране холестерина, конечных продуктов липотоксического промежуточного метаболизма в клетках, что оказывает влияние на вязкость крови, упругость эритроцитов и их мембраны [1, 2].

В комплексной диагностике гиперхолестеролемии и атеросклероза актуален поиск эффективных экспресс методов оценки структуры эритроцитов. Акустический анализ физических параметров эритроцитов позволяет точно и быстро оценить упругие свойства клеток в целом и их поверхности [3, 4].

Цель исследования — оценка акустическим методом упругости эритроцитов крыс с алиментарной дислипидемией и интактных животных.

Материалы и методы. Материалом исследования служила цельная кровь, стабилизированная K_3EDTA , плазма и суспензия эритроцитов крыс с гиперхолестеролемией. Модель гиперлипидемии индуцировали у 10 беспородных половозрелых крыс-самцов с массой тела 220–250 г атерогенным рационом, содержащим 10% холестерина и 1% холевой кислоты в масляной суспензии (из расчета 1,0 мл жировой нагрузки на 100 г массы тела) в течение 1,5 месяцев [5]. Контролем служили образцы крови интактных крыс, которые содержались на стандартном рационе вивария (10 животных).

Все процедуры на лабораторных животных осуществлялись в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986).

Упругость эритроцитов исследовали акустическим методом на анализаторе АКБа-01 «БИОМ». Метод акустической интерферометрии позволяет определять ультразвуковые характеристики биологических жидкостей в малых (порядка 100 мкл) объемах образца по положению и ширине характерных резонансных пиков [3]. На основании показаний прибора рассчитывается упругость эритроцита по формуле:

$$G = \frac{(\text{АКП}_{\text{цельной крови}} - \text{АКП}_{\text{плазмы}})}{\text{RBC}(\times 10^{-12}/\text{л})},$$

где АКП — акустический параметр:

$$\text{АКП} = \left(\frac{V_{\text{образца}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} - 1 \right) \times 10^3$$

Если в расчетной формуле не учитывать содержание гемоглобина в пробах, то акустический параметр отражает состояние внутриклеточной вязкости эритроцитов и клеток в целом. С учетом содержания гемоглобина в пробах показатель упругости эритроцитов отражает в основном структурные особенности мембраны и цитоскелета эритроцитов:

$$G / \text{HGB} \times 100 = \frac{(\text{АКП}_{\text{цельной крови}} - \text{АКП}_{\text{плазмы}})}{\text{RBC}(\times 10^{-12}/\text{л}) \times \text{HGB}(\text{г}/\text{л})}$$

Показатели упругости эритроцитов выражали в относительных единицах.

Исследования состава липидов эритроцитов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Липиды экстрагировали методом Фолча. Фракционирование липидов проводили последовательно в двух системах растворителей. Для количественной оценки содержания отдельных фракций липидов: лизофосфатидилхолин (ЛФХ); сфингомиелин (СМ); фосфатидилхолин (ФХ); фосфатидилэтаноламин (ФЭА); ОФЛ (общие фосфолипиды); холестерол (ХОЛ); триглицериды и свободные жирные кислоты (ТГ+СЖК); эфиры холестерола (ЭХОЛ) пластинки сканировали. Затем при использовании программы OneDscan Version 1.3 оценивали относительное содержание каждой фракции и выражали в %.

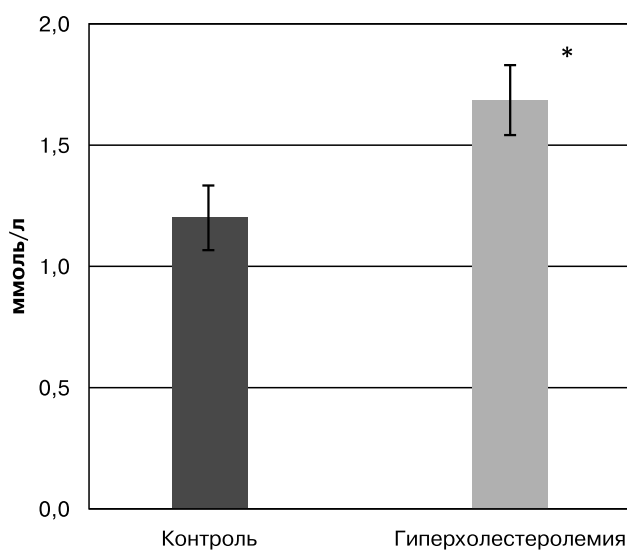
Содержание общего холестерола в крови оценивали с использованием набора SPINREACT (Испания).

Определение эритроцитарного ряда производили на автоматическом анализаторе Abacus Junior 30. Оценивали концентрацию в крови гемоглобина (HGB), количество эритроцитов (RBC), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), ширину распределения эритроцитов по объему (RDW).

Обработка данных. Результаты обработаны с помощью программ Statistica v.10.0 («StatSoft Inc.», США), BioStat 2009 v.5.8.3.0 («Analyst-Soft», США) и Excel («Microsoft», США). Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий упругости эритроцитов, содержание холестерола в плазме и относительного содержания отдельных фракций липидов в эритроцитах крыс с алиментарной дислипидемией по сравнению с контролем оценивали с помощью критерия Стьюдента. Для оценки зависимости упругости эритроцитов от содержания холестерина в крови использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Анализ уровня холестерола в крови крыс после относительно коротких сроков содержания животных на атерогенном рационе (не более двух месяцев), показал, что через полтора месяца от начала моделирования экспериментального атеросклероза количество холестерола в крови достоверно увеличилось по сравнению с таковым в контроле на 40,8% (рис. 1), что свидетельствует о наличии гиперхолестеринемии у крыс опытной группы.

При анализе относительного содержания липидных фракций эритроцитов у крыс с алиментарной дислипидемией, отмечено накопление холестерола в клетках по сравнению с контролем на 21,1% (табл. 1).



Примечание: * — статистически значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Рис. 1. Содержание холестерола в крови интактных животных (контроль) и крыс на фоне алиментарной дислипидемии по сравнению с контролем

Соотношение холестерол/фосфолипиды эритроцитов крыс опытной группы ($0,98 \pm 0,02^*$) увеличивалось по сравнению с контрольными значениями ($0,77 \pm 0,03$) на 27,3%.

Анализ структуры эритроцитов показал увеличение упругости эритроцитов (G) крыс опытной группы по сравнению с контрольными значениями на 34,6%, и их поверхностных характеристик (G/HGB*100) по сравнению с контрольными значениями на 29,8% (рис. 2).

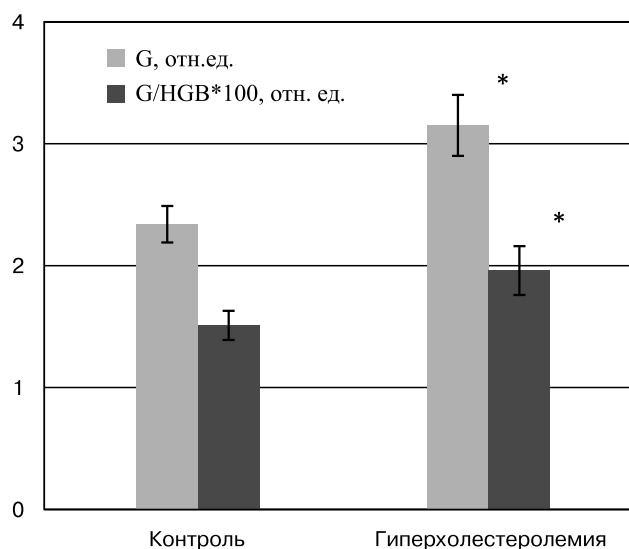
Обнаружены зависимости упругости эритроцитов как в целом (G) ($r = 0,8$; $p = 0,0006$), так и поверхностных характеристик клеток крови ($r = 0,66$; $p = 0,03$) от содержания холестерина в крови.

Гематологический анализ крови крыс не показал существенных отличий эритроцитарных показателей у крыс с гиперхолестеремией по сравнению с контролем (табл. 2).

Обсуждение. В представленной работе состояние устойчивой дислипидемии наблюдали, начиная с 1,5 месяцев содержания крыс на атерогенном рационе. Физико-химические изменения эритроцитарной мембраны при дислипидемии могут быть обусловлены составом липидов, в частности, насыщением мембраны эритроцита холестерином, что влияет на вязкость липидного бислоя путем ограничения подвижности жирнокислотных цепей [1]. Увеличение соотношения холестерол/фосфолипиды в эритроцитах крыс с алиментарной дислипидемией свидетельствует об относительной фосфолипидной недостаточности мембраны эритроцитов крыс опытной группы, вследствие этого, может снижаться ферментативная актив-

ность, изменяться взаимодействие фосфолипидов и белков, что повлияет на белок-белковые контакты, контакты с клеточным цитоскелетом, с системами транспорта [6]. Данные процессы будут снижать проницаемость мембраны, сдерживать деформационные способности эритроцитарной мембраны, влиять на ее микровязкость, снижая текучесть, а также оказывать влияние на внутриклеточную вязкость [6, 7].

Корреляционный анализ показал наличие высокой взаимосвязи между упругостью эритроцитов крыс в целом (G) и содержанием холестерина



Примечание: * — статистически значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Рис. 2. Упругость эритроцитов (G), (G/HGB*100) крыс на фоне алиментарной дислипидемии по сравнению с контролем

Таблица 1. Относительное содержание отдельных фракций нейтральных липидов и фосфолипидов эритроцитов крыс на фоне алиментарной дислипидемии по сравнению с контролем, % ($M \pm m$)

Липидные фракции	ЛФХ	СМ	ФХ	ФЭА	ОФЛ	ХОЛ	ТГ+СЖК	ЭХОЛ
Контроль (n=10)	2,7±1,2	9,8±2,5	20,9±4,5	19,9±3,5	52,3±5,3	39,9±5,2	3,4±1,1	3,4±1,5
Гиперхолестеремия (n=10)	1,8±0,9	10,2±2,9	18,1±3,7	18,9±2,8	49,0±4,2	48,3±4,4*	1,4±0,8	1,3±0,9

Примечание: * — статистически значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Содержание эритроцитов, гемоглобина и эритроцитарные индексы крови крыс на фоне алиментарной дислипидемии по сравнению с контролем ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=10)	Гиперхолестеремия (n=10)
RBC, $\cdot 10^{12}/л$	9,54 ± 0,23	9,15 ± 0,44
HGB, г/л	154,60 ± 3,12	151,10 ± 5,72
HCT, %	47,80 ± 1,24	46,46 ± 1,62
MCV, фл	50,20 ± 0,32	50,90 ± 1,10
MCH, пг	16,20 ± 0,24	16,53 ± 0,34
RDWc, %	15,82±0,11	16,01±0,43

в крови, а также наличием заметной взаимосвязи между упругостью поверхности эритроцитов (G/HGB) и содержанием холестерина в крови.

Таким образом, накопление холестерина в крови крыс после непродолжительных сроков моделирования гиперхолестеремии привело к изменениям физико-химических параметров эритроцитов — увеличению внутренней вязкости эритроцитов (G) и поверхности клеток ($G/HGB*100$).

Выводы. 1. Показано увеличение упругости эритроцитов в целом (G) и поверхности красных

клеток ($G/HGB*100$) крыс с алиментарной дислипидемией по сравнению с контролем.

2. Выявлены зависимости упругости эритроцитов (G) и ($G/HGB*100$) от содержания холестерина в плазме.

3. Изменения акустических параметров эритроцитов крыс с повышенным содержанием холестерина в крови могут быть обусловлены липидными перестройками клеток, в частности, накоплением холестерина и увеличением соотношения холестерол/фосфолипиды эритроцитов крыс.

Благодарность.

Авторы выражают искреннюю благодарность к.б.н. В. А. Клемину за оказание консультативной помощи при проведении акустических исследований.

Литература

1. Лопухин Ю. М. Холестериноз / Ю. М. Лопухин, А. И. Арчаков, Ю. А. Владимиров, Э. М. Коган — М: Медицина, 2005. — 352 с.
2. Lee C. Y. Rheological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia / C. Y. Lee, K. C. Kim, H. W. Park, J. H. Song, C. H. Lee // Microvascular Research. — 2004. — V. 67. — №. 2. — P. 133–138.
3. Клемина А. В. Акустическая интерферометрия биологических жидкостей для медицинской лабораторной диагностики: Автореферат дис. к.ф.-м.н. — Нижний Новгород, 2010. — 129 с.
4. Стародумова А. И. Акустическая интерферометрия эритроцитов в условиях гипергликемии in vitro / А. И. Стародумова, Т. А. Веселова, С. А. Боаге, А. В. Клемина, А. П. Веселов // Медицинский альманах. — 2018. — № 6. — С. 113–116.
5. Рыжак А. П. Антиатеросклеротическое действие пептидного геропротектора / А. П. Рыжак, Б. И. Кузник, В. Н. Рутковская, Г. А. Рыжак // Успехи геронтологии. — 2012. — Т. 25. — №. 1. — С. 139–142.
6. Боровская М. К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменение при патологиях разного генеза / М. К. Боровская, Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова, Л. Б. Корякина, Т. Е. Курильская, Ю. И. Пивоваров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — Т. 3[73]. — С. 334–354.
7. da Silva Garrote-Filho M. Influence of erythrocyte membrane stability in atherosclerosis / M. da Silva Garrote-Filho, M. Bernardino-Neto, N. Penha-Silva // Current Atherosclerosis Reports. — 2017. — V. 19. — №. 4. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0653-2>.

Starodumova A., Veselova T., Nizova T., Mysyagin S., Veselov A.

Acoustic interferometry of erythrocytes with hypercholesterolemia

Abstract. Structural remodeling of erythrocytes in conditions of hypercholesterolemia may be associated with the accumulation of cholesterol in the cell membrane, the end products of lipotoxic intermediate metabolism in cells, which affects on the physicochemical characteristics of erythrocytes and blood viscosity. Structural changes of erythrocytes reflect the severity of pathology. The search for new inexpensive express methods for the diagnosis of dyslipidemia is relevant. The aim of the study was to evaluate, by the acoustic method, the

erythrocyte elasticity of rats with alimentary dyslipidemia and intact animals. The study material was whole blood, stabilized with K_3EDTA , plasma and suspension of erythrocytes of rats with hypercholesterolemia. The model of hyperlipidemia was induced in 10 outbred male rats with a body weight of 220–250 g by an atherogenic diet. Erythrocyte elasticity was investigated by acoustic method. The relative content of individual lipid fractions was evaluated by thin layer chromatography. Determination of erythrocyte hematological parameters was made on an automatic analyzer. An increase in the elasticity of erythrocytes in rats with alimentary dyslipidemia has been shown. Indicators of elasticity of erythrocytes depended on the plasma cholesterol and the relative cholesterol content of rat's erythrocyte. The possibility of using acoustic erythrocyte interferometry in the complex diagnosis of atherosclerosis has been shown.

Key words: hypercholesterolemia, atherosclerosis, erythrocyte elasticity, ultrasonic interferometry, diagnostics.

Authors:

Starodumova A. — postgraduate. Federal Autonomous Educational Institution of Higher Education. N. I. Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod; e-mail: Starodumovasa@gmail.com;

Veselova T. — PhD (Biol. Sci); e-mail: Veselova-TA@yandex.ru;

Mysyagin S. — PhD (Biol. Sci); e-mail: Smysyagin@inbox.ru;

Veselov A. — Dr. Habil (Biol. Sci); e-mail: e-mail: Veselov@ibbm.unn.ru.

Federal Autonomous Educational Institution of Higher Education N. I. Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University; 603950, Russia, Nizhny Novgorod? Gagarin Ave., 23.

References

1. Lopukhin U. M. KHolesterinoz / U. M. Lopukhin, A. I. Archakov, U. A. Vladimirov, E. M. Kogan — M: Medicine, — 2005. — 352 p.
2. Lee C. Y. Reological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia / C. Y. Lee, K. C. Kim, H. W. Park, J. H. Song, C. H. Lee // Microvascular Research. — 2004. — V. 67. — №. 2. — P. 133–138.
3. Klemina A. V. Acoustic interferometry of biological fluids for medical laboratory diagnostics: Abstract dis. PhD. — Nizhnij Novgorod, 2010. — 129 p.
4. Starodumova A. I. Acoustic interferometry of erythrocytes in conditions of hyperglycemia in vitro / A. I. Starodumova, T. A. Veselova, S. A. Boage, A. V. Klemina, A. P. Veselov // Meditsinskij al'manakh. — 2018. — № 6. — P. 113–116.
5. Ryzhak A. P. Antiatherosclerotic effect of the peptide geroprotector / A. P. Ryzhak, B. I. Kuznik, V. N. Rutkovskaya, G. A. Ryzhak // Uspekhi gerontologii. — 2012. — V. 25. — №. 1. — P. 139–142.
6. Borovskaya M. K. Structural and functional characteristics of the erythrocyte membrane and its change in pathologies of different genesis / M. K. Borovskaya, E. H. Kuznetsova, V. G. Gorokhova, L. B. Koryakina, T. E. Kuril'skaya, Yu. I. Pivovarov // Byulleten' VSNTS SO RAMN. — 2010. — V. 3[73]. — P. 334–354.
7. da Silva Garrote-Filho, M. Influence of erythrocyte membrane stability in atherosclerosis / M. da Silva Garrote-Filho, M. Bernardino-Neto, N. Penha-Silva // Current Atherosclerosis Reports. — 2017. — V. 19. — №. 4. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0653-2>.