

УДК: 577.122.02:616.127-092

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ КАРБОНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МИОКАРДА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Швец В.Н.

Исследования показали, что при иммобилизационном стрессе в постмитохондриальной фракции сердца крыс обеих возрастных групп происходит повышение концентрации карбонилированных белков, хотя в митохондриальной фракции она остается на исходном уровне. Причиной этого сдвига является понижение эффективности функционирования антиоксидантной системы цитозоля миокардиальных клеток при стрессе.

Ключевые слова: иммобилизационный стресс, сердце, старение, карбонилированные белки.

ВВЕДЕНИЕ

При старении происходит повышение чувствительности сердца к действию стрессорных факторов [1, 2], что предопределяет широкое распространение сердечно-сосудистых заболеваний среди возрастной патологии [3]. Принимая во внимание современные представления о значении стимуляции свободнорадикальных процессов в патогенезе стрессорного повреждения миокарда [4 – 6], можно предположить взаимосвязь между возрастным повышением чувствительности сердца к свободнорадикальному повреждению и увеличением его чувствительности к действию стрессорных факторов при старении. Ранее уже были установлены особенности стимуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердце крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе [6, 7]. Однако, помимо липидов, в процесс свободнорадикального окисления интенсивно вовлекаются и другие классы органических веществ. Особое значение среди них имеют белки [8, 9]. Окислительная модификация белковых молекул вносит существенный вклад в механизм свободнорадикального повреждения клеток [10]. Более того, в литературе встречаются указания о большей чувствительности белков к свободнорадикальному окислению, чем липидов [11]. Учитывая это, с целью расширения существующих представлений о роли свободнорадикальных процессов в повреждении миокарда и возрастных аспектах данного вопроса, были изучены особенности накопления карбонилированных белков в субклеточных фракциях миокарда у взрослых и старых крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 36 крысах самцах линии Вистар. Использовались животные двух возрастов: взрослые (10 - 12 мес.) и старые - (22 – 25 мес.). Обе группы животных в свою очередь делились на 2 подгруппы: 1 – интактные и 2 - крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30-ти минут.

Эффективность воспроизведения стресса контролировалась на основании измерения в крови концентрации 11-оксикортикостероидов.

Животные декапитировались. Извлекалось сердце. Миокард измельчался ножницами и гомогенизировался с 0,25 М сахарозы с 0,01М Трис (рН 7,4) в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма. Гомогенат сердечной мышцы фильтровался через 4 слоя марли и центрифугировался 10 минут при 1000g. Супернатант повторно центрифугировался 20 минут при 10000 g. Надосадочная жидкость использовалась в исследованиях в качестве постмитохондриальной фракции, а осадок повторно промывался средой гомогенизации при тех же условиях. Отмытый осадок представлял собой грубую митохондриальную фракцию. Все процедуры проводились при 4-6оС.

В специальных экспериментах постмитохондриальная фракция использовалась для получения цитозольной фракции миокарда. С этой целью супернатант, полученный после центрифугирования при 10000 g, подвергался центрифугированию при 100000 g в течение часа на ультрацентрифуге MOM 3180 (Венгрия).

В пробах субклеточных фракций измерялось содержание карбонилированных белков по определению интенсивности светопоглощения их фенилгидразонов при 363 нм и 270 нм [12]. Помимо этого в постмитохондриальной фракции определялось содержание восстановленного глутатиона [13]. В цитозольной фракции миокарда измерялась активность каталазы [14] и супероксиддисмутазы [15]. Концентрация белка определялась по методу Лоури.

Полученные результаты подвергались статистической обработке с использованием непараметрического метода Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1

Таблица 1.

Возрастные особенности изменения содержания карбонилированных белков (мкмоль/мг белка) в сердце крыс при иммобилизационном стрессе ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

| Максимум поглощения фенилгидразона | Взрослые | | Старые | |
|------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | Интактные | Стресс | Интактные | Стресс |
| Митохондриальная фракция | | | | |
| 363 нм | 5,6 + 0,8 | 4,9 + 0,6 | 6,4 + 0,7 | 5,7 + 0,6 |
| 270 нм | 0,065 + 0,009 | 0,083 + 0,016 | 0,058 + 0,016 | 0,054 + 0,004 |
| Постмитохондриальная фракция | | | | |
| 363 нм | 3,3 + 0,1* | 4,0 + 0,2* | 3,3 + 0,5 | 4,4 + 0,3* |
| 270 нм | 0,061 + 0,002 | 0,072 + 0,001* | 0,054 + 0,004 | 0,073 + 0,003* |

Примечание: В исследованиях использовалось 5 – 6 крыс, * - P < 0,05 к интактным

Из нее видно, что содержание карбонилированных белков в митохондриальной и постмитохондриальной фракции сердца старых крыс достоверно не отличается от такового у взрослых животных ($P > 0,05$). Однако при этом в митохондриальной фракции старых крыс выявляется тенденция к увеличению концентрации карбонилированных белков, максимум поглощения фенилгидразонов которых соответствует 363 нм.

После 30-минутной иммобилизации в митохондриальной фракции миокарда крыс обеих исследованных возрастных групп не происходит изменения содержания карбонилированных белков. В то же время, в постмитохондриальной фракции взрослых животных, подвергнутых иммобилизации, происходит увеличение концентрации карбонилированных белков, фенилгидразоны которых имеют максимум поглощения при 363 нм и 270 нм на 21% и 18% соответственно, по сравнению с их исходным уровнем. У старых иммобилизованных крыс происходит увеличение содержания карбонилированных белков, фенилгидразоны которых имеют максимум поглощения при 363 нм и 270 нм на 33% и 35% соответственно, по сравнению с величиной аналогичных показателей у интактных животных этого возраста.

Полученные данные указывают на то, что при иммобилизации взрослых и старых крыс у них не происходит изменения концентрации карбонилированных белков в митохондриальной фракции сердца. Однако их содержание возрастает в постмитохондриальной фракции миокарда. Причем, у старых животных, величина данного сдвига оказывается значительно выше, чем у взрослых.

Увеличение концентрации карбонилированных белков в постмитохондриальной фракции миокарда свидетельствуют о том, что при иммобилизационном стрессе в ней происходит повышение скорости свободнорадикального окисления белков. Одной из причин возникновения подобного сдвига может быть понижение эффективности функционирования антиоксидантной системы в цитозоле миокардиальных клеток.

Оценивая возможные причины изменения состояния антиоксидантной системы в миокарде крыс при стрессе можно предположить особую роль в том изменения концентрации восстановленного глутатиона [16] и нарушения функционирования ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты [17]. Учитывая это, далее было проведено их исследование в постмитохондриальной и цитозольной фракции миокарда взрослых и старых крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

Как видно из данных, представленных на рис.1, в постмитохондриальной фракции сердца крыс обеих возрастных групп, подвергнутых иммобилизационному стрессу, происходит уменьшение содержания восстановленного глутатиона.

У старых животных этот сдвиг выражен в большей мере, чем у взрослых. Принимая во внимание характер полученных результатов, а также современные представления об особой роли глутатиона в защите клеток от свободнорадикального повреждения [16], можно прийти к заключению о том, что уменьшение его содержания при иммобилизационном стрессе выступает в качестве одной из основных причин стимуляции свободнорадикальных процессов в сердце и, как следствие того, накопления карбонилированных белков в постмитохондриальной фракции миокарда.

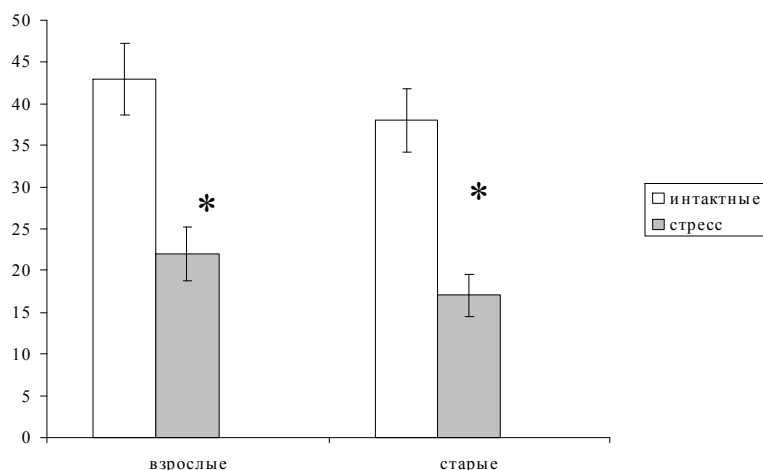


Рис.1. Содержание восстановленного глутатиона (нмоль / г белка) в постмитохондриальной фракции миокарда взрослых и старых крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу. В экспериментах использовалось по 5 – 6 крыс.

* - $P < 0,05$ к интактным

Другой причиной стимуляции свободнорадикальных процессов и, соответственно, накопления карбонилированных белков в постмитохондриальной фракции сердца может быть нарушение функционирования ферментов первой линии антиоксидантной защиты в цитозоле кардиомиоцитов. Проявлением того служит изменение соотношения между активностью СОД и каталазы в цитозольной фракции миокарда взрослых и старых иммобилизованных крыс, в большей мере выраженное у старых животных (рис.2).

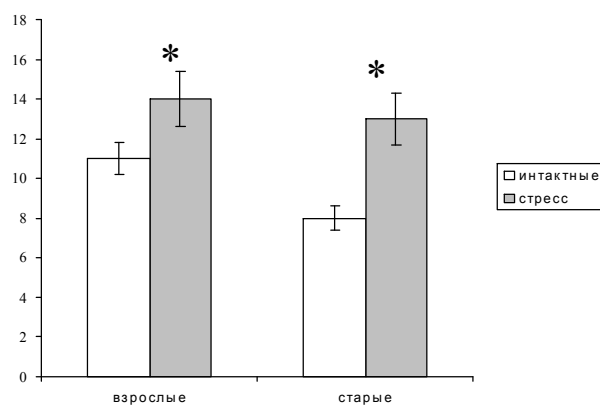


Рис.2. Соотношение активности каталазы и СОД (каталаза/СОД) в цитозольной фракции миокарда взрослых и старых крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу. В экспериментах использовалось по 5 – 6 крыс.

* - $P < 0,05$ к интактным

ВЫВОДЫ

1. Нарушение функционирования систем антиоксидантной защиты предопределяет повышение скорости свободнорадикального окисления белков и, как следствие того, накопление их карбонильных продуктов в постмитохондриальной фракции сердца животных, подвергнутых 30-минутной иммобилизации. Этот сдвиг отражает возникновение у них состояния оксидативного стресса. Подтверждением того служат и ранее полученные нами данные об усилении ПОЛ в миокарде взрослых и старых иммобилизованных крыс.
2. Интенсивность проявления оксидативного стресса в сердце старых, подвергнутых иммобилизации крыс, больше, чем у взрослых животных. Это, по всей вероятности, выступает в роли одного из основных факторов повышения чувствительности миокарда к стрессу при старении. Причины появления возрастных изменений со стороны антиоксидантной системы, лежащие в основе данного феномена, не ясны. Их изучению будут посвящены наши дальнейшие исследования

Список литературы

1. Lakatta E.G. Heart aging: a fly in the ointment // *Circ.Res.* – 2001. – vol.88. – P.984 - 986.
2. Lakatta E.G., Sollott S.J., Pepe S. The old heart: operation on the edge // *Novartis Found. Symp.* – 2001. – vol. 235. - P.172 - 196.
3. З.Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. - Киев: Наукова Думка, 1994. - 320 с.
4. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. - М.: Медицина, 1984. - 270 с.
5. Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T., Svec P. Lipid peroxidation during acute stress // *Pharmazie.* – 1996. – vol. 51, N1. – P. 51 – 53.
6. Davydov V.V., Shvets V.N. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress // *Exp.Gerontol.*- 2001.- Vol.36.- P.1155-1160.
7. 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. - Vol. 38, № 4. - P. 693-698.
8. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease// *Free Radical Biol. Med.* – 2002. - Vol. 32,N9. – P. 790-796.
9. Levine R.L., Stadtman E.R. Oxidative modification of proteins during aging// *Exp. Gerontol.* – 2001. - vol. 36,N9. – P. 1495-1502
10. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease/ M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T.Dean// *Free Radic.Biol. Med.* – 1999. – Vol.27,N11-12. – P.1151-1163.
11. Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria// *Free Radic. Res.* – 1998. – vol.29, N4. – P.297-305.
12. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // *Вопросы мед. химии.* – 2000. – № 4. – С. 36 – 47.
13. Verbunt R.I.A.M., van Dockum W.G., Bastiaanse E.M.L. et al. Glutathione disulfide as an index of oxidative stress during postschismic reperfusion in isolated rat hearts//*Mol.Cell.Cardiol.* –1995. – Vol.144. – P. 85 – 92.
14. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление липидов и радиация. - Киев: Наукова Думка, 1991.- 256 с.
15. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопросы мед. химии.* - 1990.- Т.36, N2. - С. 28-35.

16. Seo Y.J., Lee J.W., Lee E.H. et al. Role of glutathione in the adaptive tolerance to H₂O₂// Free Radic. Biol. Med. – 2004. – Vol.37, N8. – P. 1272 – 1281.
17. Мурадян Ф.Х., Утко Н.А., Мозжухина Т.Г. и др. Коррелятивные связи между активностью СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в печени мышей// Укр. Биохим. Ж. – 2003 – Т.75, N2. – С. 33- 37.

Швец В.М. Вікові особливості накопичення карбонілірованих білків у субклітинних фракціях міокарду при іммобілізаційному стресі // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 1. – С. 169-173.

Дослідження показали, що при іммобілізаційному стресі у постмітохондріальній фракції серця щурів обох вікових груп проходить підвищення концентрації карбонілірованих білків, хоча в мітохондріальній фракції вона залишається на початковому рівні. Причиною цього зсуву є зниження ефективності функціонування антиоксидантної системи цитозолу міокардіальних клітин при стресі.

Ключові слова: іммобілізаційний стрес, серце, старіння, карбоніліровані білки.

Shvets V.N. Age-specific peculiarities of the accumulation of carbonylated proteins in subcellular fractions of myocardium under immobilization stress influence// Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 1. – P.169-173.

It was shown during the investigation the increase of carbonylated proteins concentration in the postmitochondrial fraction of rats' heart for both age groups of animals under immobilization stress influence. But there was no any change in a content of these proteins in the mitochondrial fraction of rats' heart at the same condition of the investigation. The reason for the described change of proteins content is the decrease of the efficiency of antioxidant system function in the cytoplasm of myocardial cells under stress influence.

Key words: immobilization stress, heart, ageing, carbonylated proteins.

Пост упила в редакцию 26.03.2008 г.