

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 2. С. 3-10.

УДК [612.66+616-092] : 577.15

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОДУЛЯЦИИ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ БЕДРЕННОЙ МЫШЦЫ КРЫС

Амжад Хамдаллах¹, Давыдов В.В.^{1,2}

¹*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина*

²*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Харьков, Украина*

E-mail: vaddavydov@mail.ru

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение глутатионтрансферазной активности в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс 1,5-, 12- и 24-месячного возраста, а также особенностей ее модуляции под влиянием факторов, возникающих в клетках в условиях оксидативного стресса. Исследования показали, что активность ГТ с увеличением возраста животных повышается. Одновременно меняется чувствительность фермента к ингибирующему эффекту ацидоза и понижению концентрации восстановленного глутатиона. Для 1,5-месячного возраста (пубертат) характерна наименьшая базальная активность глутатионтрансферазы и ее наибольшая чувствительность к действию ряда факторов вызывающих ее понижение в условиях оксидативного стресса.

Ключевые слова: глутатионтрансфераза, миоплазма, бедренная мышца, онтогенез, оксидативный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе индивидуального развития изменяется структура и функциональная активность скелетной мускулатуры. В позднем онтогенезе подобные изменения сопровождаются развитием саркопении, которая характеризуется уменьшением массы мышечной ткани и силы мышечного сокращения [1, 2]. Существует достаточно много причин, приводящих к развитию саркопении при старении [3, 4]. Особого упоминания среди них заслуживает оксидативный стресс [5, 6]. Следует заметить, что в качестве своеобразного мессенджера повреждения при оксидативном стрессе выступают накапливающиеся при нем карбонильные продукты свободнорадикального окисления [7]. Образуя аддукты с белками, нуклеиновыми кислотами и аминокислотами, они способствуют появлению характерных для саркопении сдвигов (дисфункции митохондрий, апоптозу, торможению ответа мышечной ткани на действие анаболиков и др.) [2-4]. Принимая это во внимание, можно думать о том, что устойчивость к развитию

саркопении во многом зависит от состояния внутриклеточных ферментативных систем катаболизма карбонильных продуктов метаболизма, связанным с функционированием альдегиддегидрогеназ, альдегидредуктаз и глутатионтрансфераз (ГТ) [8, 9]. Наибольший вклад в этот процесс вносит глутатионтрансфераза [8, 9]. Вместе с тем, до настоящего времени их изучению в скелетной мышце все еще не уделялось должного внимания. Учитывая это, целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение активности ГТ в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс разного возраста, а также особенностей ее модуляции под влиянием факторов, возникающих при оксидативном стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 30 крыс самцов линии Вистар. Животных делили на 3 возрастные группы: 1 – 1,5-месячные (крысы в возрасте полового созревания); 2 – 12-месячные (взрослые половозрелые); 3 – 24-месячные (старые).

Крыс декапитировали, извлекали бедренную мышцу и немедленно помещали ее в охлажденный 0,9% раствор хлористого натрия. После отмывания от крови кусочки мышечной ткани тщательно измельчали ножницам. Навеску мышечной кашицы смешивали из расчета 1 : 3 (масса:объем) с солевой средой, содержащей 0,05 М Трис, 0,005 М сульфата магния и 0,001 М ЭДТА (рН 7,4) и гомогенизировали в течение 3 минут в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эльвегейма с тефлоновым пестиком. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Супернатант переносили в чистые центрифужные пробирки и центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры по фракционированию гомогената мышцы проводили при 4 – 5°C.

В постмитохондриальной фракции бедренной мышцы определяли активность ГТ [10]. Для выяснения особенностей модуляции ферментативной активности изменяли состав реакционной смеси, в которой проводили ее измерение. Детали подобных экспериментов изложены в разделе “Результаты исследований”. Содержание белка в пробах определяли по методу O. Lowry et al. [11].

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием пакетов прикладных программ Excel и «SPSS Statistics 17,0», с помощью непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney. Различия между данными считали достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что глутатионтрансферазная активность с увеличением возраста животных повышается (рис.1). При этом у взрослых животных она становится на 83 % выше, чем у 1,5-месячных, а у старых – на 32% выше, чем у взрослых соответственно.

Принимая во внимание тот факт, что основной путь утилизации эндогенных альдегидов в цитозоле связан с их конъюгацией с глутатионом в глутатионтрансферазной реакции [8, 9], можно предположить, у крыс пубертатного возраста ограничена скорость катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в миоплазме мышечных волокон. Это, в свою очередь, предполагает повышение чувствительности мышечных клеток в повреждающему действию оксидативного стресса, сопровождающегося повышением образования альдегидов. В тоже время следует заметить, что в процессе онтогенеза могут существенно меняться регуляторные свойства ферментов.

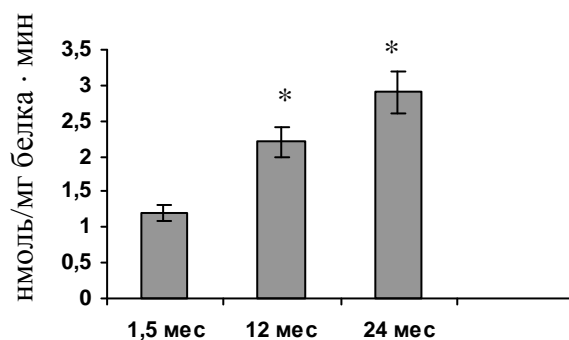


Рис. 1. Активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов (в нмоль/мг белка · мин) в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы интактных крыс разного возраста. * - $P < 0,05$ к 1,5-месячным.

Поэтому в условиях изменения состава внутриклеточной среды при оксидативном стрессе их каталитические свойства тоже будут изменяться. И эти изменения, по всей вероятности, носят зависимый от возраста характер. Все это может серьезно модулировать скорость утилизации эндогенных альдегидов в мышечных клетках *in situ*, а значит вносить коррективы в отношении чувствительности мышечных клеток к повреждающему действию оксидативного стресса.

Учитывая выше изложенное, дальше было проведено изучение особенностей влияния ряда факторов, возникающих в условиях оксидативного стресса, на глутатионтрансферазную активность. К таковым относятся возникновение метаболического ацидоза, накопление активных форм кислорода и карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, а также понижение уровня восстановленного глутатиона [12]. Поэтому в дальнейших экспериментах было изучено влияние перечисленных факторов на глутатионтрансферазную активность в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс разного возраста. С этой целью глутатионтрансферазная активность измерялась в реакционной смеси [10], в которой: понижалась величина рН до 6,0; уменьшалась концентрация восстановленного глутатиона до 0,5 мМ; добавлялся глутаровый альдегид (0,5 мМ) или вносилась перекись водорода (10мМ) (указаны конечные концентрации).

Исследования показали, что при понижении рН реакционной смеси у 1,5- 12- и 24 месячных крыс происходит ее уменьшение на 53%, 32% и 37% соответственно, по сравнению с исходной величиной (рис. 2). Понижение концентрации восстановленного глутатиона в среде инкубации сопровождается уменьшением глутатионтрансферазной активности в постмитохондриальной фракции мышцы 1,5- и 12-месячных крыс на 50% и 28% соответственно, по сравнению с ее исходной величиной. В тоже время глутатионтрансферазная активность в мышце 24-месячных крыс не изменяется. Уменьшение глутатионтрансферазной активности наблюдается после преинкубации постмитохондриальной фракции с 0,5 мМ глутарового альдегида. При этом у 1,5-, 12- и 24-месячных крыс она понижается на 71%, 66% и 72% соответственно, по сравнению с ее исходным уровнем. Внесение в реакционную смесь для определения глутатионтрансферазной активности 10 мМ перекиси водорода не приводит к изменению ее величины.

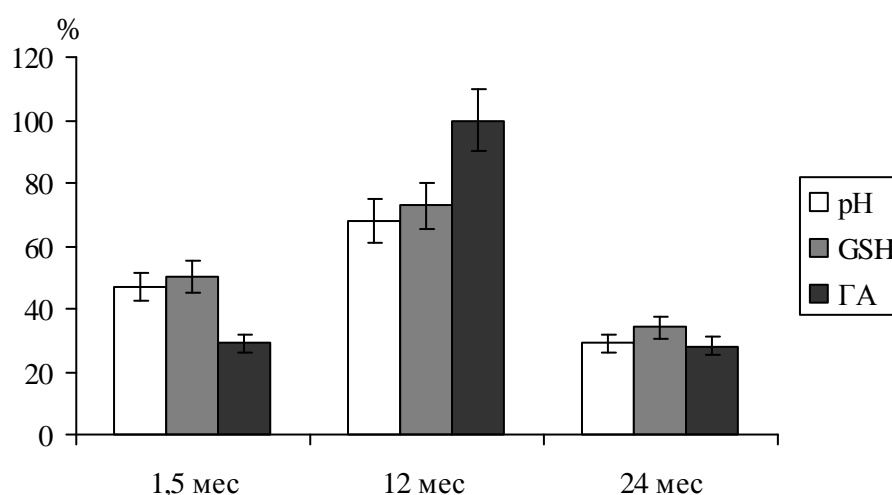


Рис. 2. Изменение глутатионтрансферазной активности в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс разного возраста при понижении рН (рН), понижении содержания восстановленного глутатиона в реакционной смеси (GSH) и после преинкубации с глутаровым альдегидом (ГА). Активность фермента в контроле (неизмененный состав реакционной смеси) принята за 100%. По результатам исследований на 6 крысах в каждой возрастной группе.

Оценивая результаты проведенных исследований можно заметить, что в процессе онтогенеза меняется чувствительность глутатионтрансферазы к действию исследованных регуляторных факторов. При этом наименьшей чувствительностью к эффекту пониженного рН и уменьшению концентрации субстрата (глутатиона) обладает фермент из мышцы старых животных, а наибольшей – фермент из мышцы крыс пубертатного возраста. Однако все они в равной мере ингибируются после преинкубации постмитохондриальной фракции с глутаровым альдегидом.

Анализ полученных данных позволяет высказать предположение о том, что в пубертатном возрасте в миоплазме мышечных волокон возникает неблагоприятная ситуация с катаболизмом эндогенных альдегидов. Причиной того, является сравнительно низкая базальная активность глутатионтрансферазы и ее высокая чувствительность к ингибирующему действию ряда факторов возникающих в клетке в условиях оксидативного стресса. Принимая во внимание особый вклад данного метаболического пути в утилизацию эндогенных альдегидов, можно думать о том, что в условиях оксидативного стресса в миоплазме мышечных клеток возникают предпосылки для накопления эндогенных альдегидов и, соответственно, их повреждения в условиях воздействия факторов, реализующих свое повреждающее действие через возникновение оксидативного стресса. Как следствие того, усиливается ингибирование фермента и за счет накапливающихся в клетке альдегидов.

В меньшей мере это характерно для старения. На данном этапе онтогенеза имеет место повышение глутатионтрансферазной активности и одновременное понижение чувствительности энзима к ингибирующему эффекту факторов, возникающих в клетке при оксидативном стрессе (ацидозу и понижению концентрации восстановленного глутатиона). Таким образом, формирование саркопении при старении не связано с изменением эффективности утилизации эндогенных альдегидов в миоплазме мышечной клетки.

Резюмируя выше изложенное, следует заметить, что в процессе онтогенеза происходит изменение глутатионтрансферазной активности и модуляция ее устойчивости к действию факторов, возникающих в клетке при оксидативном стрессе (метаболический ацидоз, понижение уровня восстановленного глутатиона и накопление карбонильных продуктов обмена). Все это формирует предпосылки для возрастного изменения устойчивости скелетной мышцы к действию негативных факторов оксидативного стресса. Наибольшую чувствительность к повреждению имеет мышца в пубертатном возрасте. В тоже время во взрослом возрасте и при старении в миоплазме мышцы формируются предпосылки для эффективной утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления.

Анализируя вероятные причины обнаруженных возрастных изменений со стороны активности и регуляторных свойств глутатионтрансфераз можно предположить важную роль в том изменения их изоферментного спектра в миоплазме мышечных клеток. Именно с изменением изоферментного спектра может быть связано повышение уровня базальной глутатионтрансферазной активности, а также модуляция ее регуляторных свойств. Причиной того неодинаковые каталитические и регуляторные свойства отдельных изоферментов. В основе появления этих сдвигов могут лежать возрастные особенности регуляции скорости экспрессии генов отдельных изоферментов, т.к. в роли индукторов синтеза могут выступать различные гормоны, уровень секреции которых изменяется как в пубертатном возрасте, так и при старении. Вместе с тем высказанное предположение требует экспериментальной проверки, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Глутатионтрансферазная активность возрастает с увеличением возраста животных.
2. Глутатионтрансферазная активность понижается при снижении рН среды, при уменьшении концентрации восстановленного глутатиона в среде инкубации и после преинкубации фермента с глутаровым альдегидом.
3. Для 1,5-месячного возраста (период полового созревания) характерна наибольшая чувствительность глутатионтрансферазы к действию ацидоза и понижения концентрации восстановленного глутатиона.

Список литературы

1. Czarkowska-Paczek B. Age-related muscle mass loss / B. Czarkowska-Paczek, S. Milczarczyk // *Przegl. Lek.* – 2006. – Vol. 63, № 8. – P.658 – 661.
2. Narici M.V. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance / M.V. Narici, N. Maffulli // *Br. Med. Bull.* – 2010. – Vol. 95. – P. 139 – 159.
3. Boirie Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia / Y. Boirie // *J. Nutr. Health Aging.* – 2009. – Vol. 13, № 8. – P. 717 – 723.
4. Frontera W.R. Aging of human muscle: understanding sarcopenia at the single muscle cell level / W.R. Frontera, A.R. Zayas, N. Rodriguez // *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* – 2012. – Vol. 23, № 1. – P. 201 – 207.
5. Chen C.N. Muscle disuse: adaptation of antioxidant systems is age dependent / C.N. Chen, H.M. Brown-Borg, S.G. Rakoczy, L.V. Thompson // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* – 2008. – Vol. 63, № 5. – P. 461 – 466.
6. Hindle A.G. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews / A.G. Hindle, J.M. Lawler, K.L. Campbell, M. Homing // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 155, № 4. – P. 427–234.
7. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease / K. Uchida // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, №12. – P. 1685 – 1696.
8. Davydov V.V. Possible role of aldehyde,s scavenger enzymes during aging / V.V. Davydov, N.M. Dobaeva, A.I. Bozhkov // *Exp. Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 11 – 16.
9. Давыдов В.В. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов / В.В. Давыдов, А.И. Божков, О.К. Кульчицкий. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240 с.
10. Mannervik B. Glutathione transferase / B. Mannervik, C. Guthenberg // *Methods Enzymology.* – 1981. – Vol. 77. – P. 231 – 235.
11. Lowry O.H/ Protein measurement with the Pholin phenol reagent / O.H. Lowry, K.I. Rosenbrough, A.L.Farr et al. // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 193, № 1. – P. 265 – 267.
12. Грабовецкая Е.Р. Возрастные особенности модуляции глутатионтрансферазной активности постмитохондриальной фракции миокарда крыс возникающими при стрессе факторами / Е.Р. Грабовецкая, В.В. Давыдов // *Проблемы старения и долголетия.* – 2009. – Т. 18, № 3. – С. 295–300.

Амжад Хамдаллах. Вікові особливості модуляції глутатіонтрансферазної активності в постмітохондріальній фракції стегнового м'яза щурів / Амжад Хамдаллах, В. В. Давыдов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 3-10.

Метою цього дослідження було порівняльне вивчення глутатіонтрансферазної активності в постмітохондріальній фракції стегнового м'яза щурів 1,5 - , 12 - і 24 -місячного віку, а також особливостей її модуляції під впливом факторів, що виникають в клітинах в умовах оксидативного стресу. Дослідження показали, що активність ГТ підвищується зі збільшенням віку тварин. Одночасно змінюється чутливість ферменту до інгібуючого ефекту ацидозу та зниження концентрації відновленого глутатіону. Для 1,5 -місячного віку (пубертат) характерна найменша базальна активність глутатіонтрансферази а також її найбільша чутливість до дії ряду факторів, що викликають її зниження в умовах оксидативного стресу.

Ключові слова: глутатіонтрансферази, цитозоль, стегновий м'яз, онтогенез, оксидативний стрес.