

© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2009
УДК 615.27: 577.121.7: 616 – 092.9

Активність окислювальної модифікації білків у різних тканинах дорослих щурів під впливом парафармацевтика «Він-Віта»

О.А.Орлова, О.О.Лазарчук

Луганський державний медичний університет, кафедра фармацевтичної хімії і фармакогнозії
Луганськ, Україна

Метою дослідження було вивчення активності окисної модифікації білків (ОМБ) у тканинах серця, мозку, печінки, нирок дорослих щурів під впливом геропротекторного засобу «Він-Віта». Встановлено помірне підвищення продуктів спонтанної окисної модифікації білків: альдегід- і кетопохідних динітрофенілгидразонів (АФГ, КФГ) в різних тканинах щурів. Індукована ОМБ мала тенденцію до достовірного підвищення АФГ, КФГ. Виявлено зниження активності як спонтанної, так і індукованої ОМБ під дією парафармацевтика «Він-Віта».

Ключові слова: окисна модифікація білків, старіння, геропротектор, тканини.

ВСТУП

Обговорення можливої окисної деструкції білків в організмі до останнього часу носило в основному теоретичний характер. У ряді досліджень цей процес розглядався як одна з важливих причин інактивації ферментів, зміни структурної організації білків при стані окислятивного стресу [2].

Інтенсивність окисної модифікації білка (ОМБ) залежить не тільки від різних впливів на організм, але і від характеру метаболічних процесів у клітині, а також вікових змін організму. Відомості про вікові зміни та активність ОМБ у різних тканинах суперечливі, що може бути обумовлене як розходженнями в об'єктах навчання (як видовими або лінійними, так і органами), особливостями харчового режиму тварин (вміст у кормі про- і антиоксидантів), так і обраними для порівняння віковими періодами.

У ряді досліджень [3, 11] було встановлено, що при старінні підсилюється ОМБ, причому більш інтенсивно в порівнянні з перекисним окислюванням ліпідів (ПОЛ). На процеси пероксидації білків указує нагромадження в досліджуваній тканині продуктів білкової деструкції у вигляді альдегід- і кетопохідних, що є маркерами окислювальної модифікації мембранних протеїнів.

Оскільки ОМБ носить виборчий і специфічний характер, а її продукти є маркерами раннього окислятивного стресу, то подальше дослідження цього процесу буде сприяти вдосконалюванню мір діагностики і лікування ряду патологічних станів: гіповітамінозу, ішемічного ушкодження мозку, цукрового діабету і старіння.

Використання антиоксидантів як геропротекторів засновано на вільнорадикальній теорії старіння [1, 6, 8-10]. Відповідно до цієї теорії вільні радикали, що утворюються в результаті різних окисних реакцій, ушкоджують макромолекули (нуклеїнові кислоти і білки), викликаючи їх деградацію та старіння організму.

Експериментально доведено, що вживання парафармацевтика «Він-Віта» ефективно поліпшує роботу антиоксидантної системи. Він істотно знижує ПОЛ у клітинах, плазмі та лейкоцитах крові; нормалізує показники антиоксидантної системи [4].

Аналіз отриманих на сьогодні даних дозволяє обґрунтувати доцільність зсуву акцентів в експериментальній геронтології на користь застосування геропротекторних засобів на ранніх етапах онтогенезу та вважати, що одним з ефективних підходів до істотного збільшення тривалості життя може бути збільшення активності антиоксидантної системи.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на білих щурах двох вікових груп – 16-тижневі (молоді) (n=7) і 30-

тижневі (дорослі) (n=7). Тварин утримували в стандартних умовах віварію. Експериментальну групу склали дорослі щури, які одержували парафармацевтик з геропротекторною дією «Він-Віта» протягом 30 діб (n=6). Групами контролю слугували 16-тижневі та 30-тижневі інтактні щури.

Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, потім виймали органи: серце, печінку, нирки та мозок.

Метод оцінки окислювальної модифікації білків заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразинном (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів [7]. Для ініціації окислювальної модифікації білків використали середовище Фентона: 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,4), Fe²⁺ (10⁻³ М), ЕДТА (10⁻³ М) комплекс, що готували ex tempore, і H₂O₂ (3*10⁻⁴ М) [7].

До денатурованих білків додавали 1,0 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 М НСІ. Інкубацію здійснювали при кімнатній температурі протягом 1 години, потім проби центрифугували при 3000 об/хв. протягом 20 хвилин. Осад промивали 3 рази сумішшю етанол : етилацетат (1:1) для екстракції ліпідів та 2,4-ДНФГ, що не прореагували з карбонільними групами окислених білків. Отриманий осад висушували для видалення розчинників і потім розчиняли в 8 М сечовині. Сечовину доливали до осаду в об'ємі 3,0 мл. Оптичну щільність динітрофенілгідразонів, що утворилися, реєстрували на спектрофотометрі при λ=274 нм, 363 нм. Ступінь окислювальної модифікації білків виражали в одиницях оптичної щільності, віднесених на 1 мг білка.

Статистична обробка результатів дослідження проводилася за допомогою t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз вмісту продуктів спонтанної ОМБ у різних тканинах дорослих інтактних щурів показав підвищення рівня динітрофенілгідразонів, вірогідно перевищуючий такий рівень в інтактної групи 16 тижнів (p<0,05). При цьому більш виражені зміни спостерігалися в тканині мозку. Так, збільшення показника ОМБ альдегідпохідних в інтактних 30-тижневих щурів у порівнянні з інтактними 16-тижневими складало 19,9%. Вірогідне підвищення рівня АФГ у серці дорослих інтактних щурів складало 14,2%, у печінці рівень АФГ зріс на 5,9%, а в корковому та мозковому шарі нирок — у середньому на 12,8%.

ТАБЛИЦЯ 1

Рівень АФГ (Е/мг білка) спонтанної ОМБ в різних тканинах щурів (λ=270)

Досліджувані тканини органів	Група тварин		
	Молоді (інтактні 16 тижнів)	Дорослі (інтактні 30 тижнів)	Дорослі + «Він-Віта»
Серце	3,09±0,12	3,53±0,10*	3,12±0,08**
Печінка	5,26±0,08	5,57±0,01*	5,30±0,09**
Мозок	4,08±0,3	4,89±0,12*	4,10±0,10**
Корковий шар нирок	3,90±0,21	4,33±0,14*	4,21±0,05
Мозковий шар нирок	3,46±0,16	3,96±0,12*	3,51±0,20**

Примітки: * – різниця вірогідна відносно інтактної групи 16 тижнів (p<0,05), ** – різниця вірогідна відносно інтактної групи 30 тижнів (p<0,05).

Після застосування парафармацевтика спостерігалось зниження рівня АФГ перекисно-го окислювання білків у всіх тканинах щурів у порівнянні з інтактними 30-тижневими щурами, але ці значення були нижчими, ніж у групі 16-тижневих інтактних тварин. Вірогідне зниження АФГ (p<0,05) спостерігалось в тканині серця на 11,6%, у печінці – на 4,8%, мозку – на 16,2%. Невірогідне зниження було зафіксовано в корковому шарі нирок. У мозковому шарі нирок рівень АФГ вірогідно знизився на 11,4% (табл. 1).

Слід зазначити, що більш виражено парафармацевтик діяв на рівень вмісту КФГ (табл. 2). Крім того, максимальне зниження як альдегід-, так і кетопохідних спостерігалось в мозку щурів.

При порівнянні двох інтактних груп спостерігалось достовірне збільшення як рівня

ТАБЛИЦЯ 2

Рівень КФГ (Е/мг білка) спонтанної ОМБ в різних тканинах щурів (λ=363)

Досліджувані тканини органів	Група тварин		
	Молоді (інтактні 16 тижнів)	Дорослі (інтактні 30 тижнів)	Дорослі + «Він-Віта»
серце	4,01±0,02	4,56±0,08*	4,32±0,10**
печінка	6,30±0,02	6,95±0,12*	6,45±0,13**
мозок	5,45±0,04	5,83±0,04*	5,46±0,03**
корковий шар нирок	4,83±0,07	5,32±0,21*	4,98±0,15**
мозковий шар нирок	4,07±0,05	4,25±0,13	4,21±0,20

Примітки: * – різниця вірогідна відносно інтактної групи 16 тижнів (p < 0,05), ** – різниця вірогідна відносно інтактної групи 30 тижнів (p < 0,05).

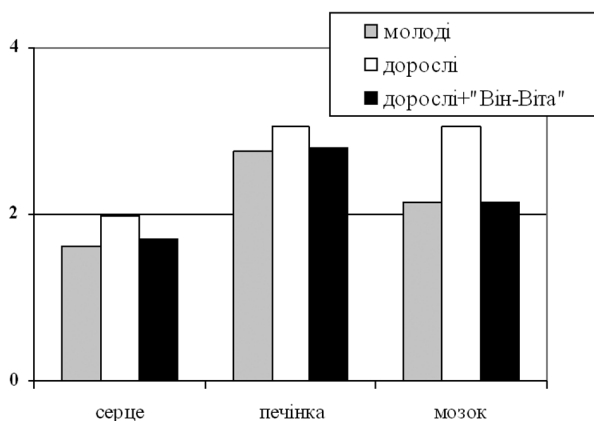


Рис. 1. Рівень АФГ (Е/мг білка) при металкаталізованій ОМБ в серці, печінці та мозку щурів (λ=274 нм).

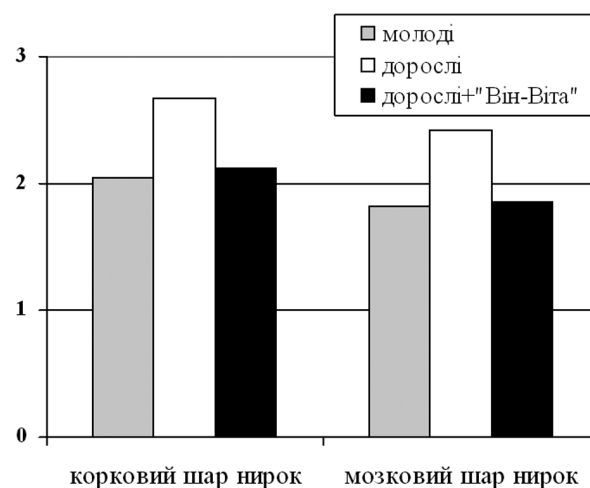


Рис. 2. Рівень АФГ (Е/мг білка) при металкаталізованій ОМБ в корковому та мозковому шарі нирок щурів (λ=274 нм).

КФГ, так і рівня АФГ, у серці — на 13,7%, печінці — на 10,3%, мозку — на 7%, мозковому шарі нирок — на 10,1%. Вірогідне зниження рівня АФГ в тканинах експериментальних щурів склало у серці — 5,3%, печінці — 7,2%, мозку — 6,3%, корковому шарі нирок — 6,4% (табл. 2).

Отже, спонтанне окислювання білків у тканинах дорослих інтактних щурів супроводжується збільшенням вмісту КФГ, що є пізнім маркером ОМБ і характеризує подальше окислювання білків. Також спостерігається незначне підвищення АФГ — продукту ОМБ, що утворився на стадії ініціації вільнорадикального окислювання. Під дією парафармацевтика у всіх тканинах дорослих щурів вірогідне зниження рівня КФГ та АФГ, можливо, пов'язане з більш ефективним функціонуванням антиоксидантної системи.

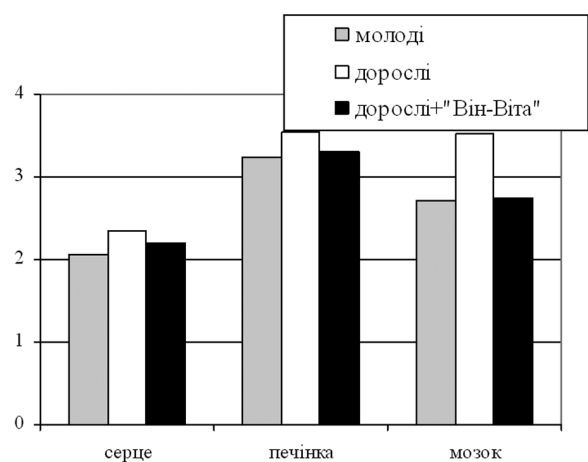


Рис. 3. Рівень КФГ (Е/мг білка) при металкаталізованій окислювальній модифікації білка в серці, печінці й мозку щурів (λ=363 нм).

При оцінці металкаталізованої ОМБ в тканинах інтактною групи 30-тижневих тварин було встановлено досить істотне збільшення ступеня деструкції білків у порівнянні з інтактними 16-тижневими, що супроводжувалося підвищенням вмісту АФГ і КФГ. Спостерігалось збільшення рівня АФГ у групі дорослих інтактних щурів у порівнянні з 16-тижневими в серці на 17,7%, печінці — на 9,8%, мозку — на 29,5%, корковому та мозковому шарі нирок — на 31,6% (рис. 1, 2).

Після прийому парафармацевтика рівень динітрофенілгідрозонів у групі експериментальних тварин знижувався в порівнянні з групою інтактних дорослих щурів.

Мінімальне зниження рівня АФГ спостерігалось в печінці на 8,8%, у серці — на 14,1%. У мозку цей показник склав максимальне значення —

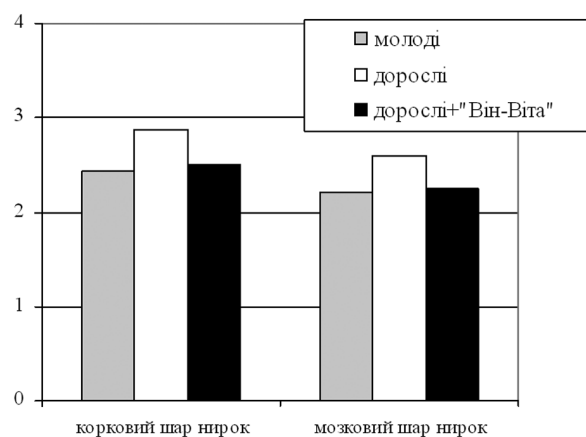


Рис. 4. Рівень КФГ (Е/мг білка) при металкаталізованій окислювальній модифікації білка в корковому й мозковому шарі нирок щурів (λ=363 нм).

на 29,5%. У корковому та мозковому шарі нирок під дією парафармацевтика рівень АФГ знизився на 20,6% та 23,6%, відповідно (рис. 1, 2).

Для металкаталізованої ОМБ, як і для спонтанної, характерним є виражене зниження кетопохідних білку експериментальної групи відносно інтактних 30-тижневих тварин. На 6,5% знизився рівень КФГ у серці та печінці щурів, що отримували «Він-Віта». Максимальне зниження вмісту КФГ спостерігалось в мозку — на 21,9%. У корковому та мозковому шарі нирок рівень КФГ знизився на 13,2%. Показники є достовірними і максимально близько наближеними до показників інтактною 16-тижневою групою тварин (рис. 3, 4).

Отже, ініційована ОМБ у тканинах дорослих інтактних щурів має тенденцію до достовірного підвищення з нагромадженням вмісту як АФГ, так і КФГ, у порівнянні з групою молодих інтактних тварин. В порівнянні з показниками спонтанної ОМБ значення вмісту продуктів окислювання білків є нижчим. Ініційована ОМБ вказує на кількість субстрату для окислення і можливість його залучення в ці процеси. В цілому, індуковану ОМБ можна розглядати як показник стійкості системи до переокислювання, індикатор стресостійкості досліджуваної тканини [13].

Геропротекторні властивості «Він-Віта» знижують вміст продуктів ОМБ у тканинах дорослих щурів до рівня їх у тканинах молодих тварин.

Літературні дані про динаміку процесу генерації АФК із віком носять суперечливий характер. Багато авторів вважають встановленим фактом, що продукція АФК при старінні зростає, і зв'язують це з окисним ушкодженням мітохондріальних мембран і порушенням функціонування електронно-транспортного ланцюгу мітохондрій [14, 15]. При старінні підсилюється утворення проміжного продукту відновлення коензиму Q (убіхінону), здатного неферментативним шляхом передавати електрони на молекулярний кисень з утворенням супероксидного радикалу. На думку інших авторів, при старінні утворення АФК зменшується внаслідок загального зниження інтенсивності окислювально-відновних процесів (окисного метаболізму). Одночасно спостерігається зниження активності СОД та інших компонентів антиоксидантного захисту, принаймні при відсутності вираженої вікової патології [13, 15].

Встановлено, що рівень окисних ушкоджень у білках не залежить ні від виду організму, ні від типу тканини, але залежить від віку

[5]. Такий результат представляється особливо дивним, оскільки різні організми, а також різні тканини сильно розрізняються за інтенсивністю метаболізму, а отже, і інтенсивністю продукції вільних радикалів. Швидкість виробництва вільних радикалів у клітині залежить, насамперед, від інтенсивності дихання. Для того, щоб при посиленні дихання ступінь ушкодження білків підтримувалася на постійному рівні, необхідно, щоб при цьому відбувалося збільшення швидкості відновлення ушкоджених білків [5]. Тобто, швидкості дихання та відновлення білків у різних тканинах і органах повинні корелювати.

В наших дослідженнях знайшло підтвердження положення про підвищення рівня ОМБ з віком. Збільшена активність окислювальної модифікації білків внаслідок накопичення вільних радикалів не може не впливати на мітохондрії та енергетичний обмін. Тому отримане нами підвищення енергетичного потенціалу в тканинах дорослих щурів, що свідчить про інтенсивність мітохондріального дихання в організмі, вказує на зв'язок між цими процесами, що збігається з точкою зору окремих авторів [15]. Є дані про зниження функції білків у ланцюзі переносників електронів при перекисному окислюванні білків [12]. У власних дослідженнях виявлена тенденція до зниження показника термодинамічного контролю дихання, що вказує на залежність швидкості дихання не від концентрації окремих компонентів аденілуколіної системи, а від стану фосфорилування.

Таким чином, отримані дані про чутливість білкових молекул до окисного ушкодження з віком збігаються з літературними даними [13], а парафармацевтик «Він-Віта» з геропротекторною дією знижує активність ОМБ у досліджених тканинах дорослих тварин до рівня молодих організмів.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено можливість нормалізації рівня ОМБ у дорослих організмів під дією парафармацевтика з геропротекторними властивостями «Він-Віта».

2. Встановлено помірне збільшення продуктів спонтанної окислювальної модифікації білків (АФГ, КФГ) у тканинах серця, мозку, печінки та нирок у інтактних дорослих щурів. Індукована ОМБ при цьому має тенденцію до достовірного підвищення з нагромадженням як АФГ, так і КФГ, але в порівнянні з показниками спонтанного перекисного окислювання білків рівень є нижчим в 2 рази.

3. Виявлено зниження активності як спонтанної, так і індукованої ОМБ під дією парафармацевтика «Він-Віта» в усіх досліджених тканинах дорослих інтактних щурів до рівня молодих.

ЛІТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Соловьев М.В. Эволюция концепций в геронтологии. — СПб.: Эскулап, 1999. — 130 с.
2. Донцов В.І., Крутько В.Н., Подколзин А.А. Фундаментальні механізми геропротекції // Проблеми геронтології. — 2002. — №3. — С. 34-36.
3. Донцов В.І., Крутько В.Н., Подколзин А.А. Старіння: Механізми й шляхи подолання. М.: Біоінформсервіс, 2001. — 240 с.
4. Литвиненко А.Г. Бабов К.Д. Звіт по НИР «Визначення антиоксидантної властивості розчину харчової добавки «Він-Віта» у мінеральних водах різних типів при моделюванні екстремальних ситуацій.» // Клінічна геронтологія. — 2005. — №5. — С. 34.
5. Обухова Л.К. Хімічні геропротектори й проблема збільшення тривалості життя // Успіхи хімії. — 2000. — Т.44. — С. 1914-1925.
6. Обухова Л.К., Эмануэль Н.М. Роль свободнорадикальных реакций окисления в молекулярных механизмах старения живых организмов // Успехи химии. — 1983. — Т.52. — С. 353-372.
7. Рижак Г.А., Коновалов С.А. Геропротекторы в профилактике возрастных патологий. — М: Омега, ОЛМА-ПРЕСС, 2004. — 210 с.
8. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hogen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 90. — P. 7915-7921.
9. Cutler R. Oxidative stress: its potential relevance to human disease and longevity determinants // Age. — 1999. — Vol. 18. — P. 91-96.
10. Harman D. Free-radical theory of aging: inverting the functional life span // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1999. — Vol. 717. — P. 1-15.
11. Hipkiss A.R. Carnosine, a protective, anti-aging peptide? // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 1999. — Vol. 30. — P. 863-868.
12. Holloway L., Butterfield G., Hintz R.L. et al. Effect of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy women // J. Clin. Endocr. Metab. — 2001. — Vol. 79. — P. 470-479.
13. Warner C.M., Briggs C.J., Meyer T.E. et al. Lymphocyte aging in allopenic mice // Exp. Gerontol. — 2000. — Vol. 20. — P. 35-45.
14. Weindruch R., Walford R. The retardation of aging and disease by dietary restriction. — Springfield, Ill.: C.C.Thomas. — 1999. — 310 p.
15. Wolf E., Kahnt E., Ehrlein J. et al. Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models // Mech. Ageing Dev. — 1999. — Vol. 68. — P. 71-87.

Е.А.Орлова, О.А.Лазарчук. Активность окислительной модификации белков в разных тканях взрослых крыс под действием парафармацевтика «Вин-Вита». Луганск, Украина.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, старение, геропротектор, ткани.

Целью исследования было изучение активности окислительной модификации белков (ОМБ) в тканях сердца, мозга, печени, почек взрослых крыс под влиянием геропротекторного средства «Вин-Вита». Установлено умеренное повышение продукции спонтанной окислительной модификации белков (АФГ, КФГ) в разных тканях крыс с возрастом. Индуцированная ОМБ имела тенденцию к достоверному повышению АФГ, КФГ. Выявлено понижение активности как спонтанной, так и индуцированной ОМБ под действием парафармацевтика «Вин-Вита».

Е.А.Orlova, O.A.Lazarchuk. Activity oxidative modification of proteins in different tissues of adult rats under parapharmaceutic «Vin-Vita» action. Lugansk, Ukraine.

Key words: modification oxidizing of albumens, aging, geroprotector, tissues.

Purpose of research was to study the activity of oxidative modification of proteins in different tissues of adult rats under parapharmaceutic «Vin-Vita» action. Development rise of products of oxidative modification proteins (AFG, KFG) is set in different tissues of rats with age.

Надійшла до редакції 11.08.2009 р.