

ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В ХРУСТАЛИКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

УДК 577.158:612.844.1

Поступила 27.12.2010 г.



И.П. Иванова, д.б.н., зав. научной проблемной лабораторией физико-химических исследований¹;
Д.И. Князев, младший научный сотрудник научной проблемной лаборатории физико-химических исследований¹;
Ю.В. Кудрявцева, к.м.н., доцент кафедры офтальмологии²;
А.Д. Чупров, д.м.н., зав. кафедрой офтальмологии²;
С.В. Трофимова, лаборант научной проблемной лаборатории физико-химических исследований¹

¹НИИ прикладной и фундаментальной медицины Нижегородской государственной медицинской академии, Н. Новгород;

²Кировская государственная медицинская академия, Киров

Цель исследования — оценить интенсивность окисления липидов и белков хрусталика и плазмы крови крыс линии Wistar в процессе старения.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 25 крысах-самцах линии Wistar четырех возрастных групп: 5, 12, 24 и 36 мес. Материалом исследования являлись хрусталики и плазма крови. Экстракцию липидов проводили методом Folch. Содержание диеновых и триеновых конъюгатов оценивали спектрофотометрически. Уровень оснований Шиффа изучали по интенсивности флуоресценции, концентрацию малонового диацетальдегида — по интенсивности взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой. Потенциальную возможность окисления субстрата в пробах оценивали с использованием метода индуцированной хемилюминесценции, степень окислительной модификации белков — по уровню карбонильных производных с 2,4-динитрофенилгидразином. Исследование содержания общих липидов и общего белка проводили с помощью наборов Bio-Test Total Lipids и «Общий Белок-Витал».

Результаты. Процессы пероксидации липидов мембран хрусталика возрастают у животных в возрасте 5—12 мес и снижаются в период 12—24 мес. Уровень продуктов липопероксидации в плазме крови имеет выраженную тенденцию к увеличению в процессе старения. С возрастом наблюдаются снижение уровня карбонильных производных аминокислот белков хрусталика и тенденция к возрастанию окислительной модификации белков в плазме крови.

Ключевые слова: старение, окисление липидов, окисление белков, хрусталик, плазма крови.

English

Oxidation of lipids and proteins in lens and blood plasma of rats in ageing

I.P. Ivanova, D.Bio.Sc., the Head of Scientific Research Laboratory of Physical and Chemical Researches¹;
D.I. Knyazev, Senior Research Worker, Scientific Research Laboratory of Physical and Chemical Researches¹;
Y.V. Kudryavtseva, PhD, Associate Professor, the Department of Ophthalmology²;
A.D. Chuprov, D.Med.Sc., the Head of the Department of Ophthalmology²;
S.V. Trofimova, Laboratorian, Scientific Research Laboratory of Physical and Chemical Researches¹

¹Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod;

²Kirov State Medical Academy, Kirov

The aim of the study is to assess the intensity of oxidation of lipids and proteins in lens and blood plasma of Wistar rats in ageing.

Materials and methods. The experiments were carried out on 25 Wistar male rats of four age groups: 5, 12, 24 and 36 months. Materials

Для контактов: Иванова Ирина Павловна, факс 8(831)465-42-81, тел. моб. +7 920-059-40-28; e-mail: ivanova.ip@mail.ru.

for study were lens and blood plasma. Lipids were extracted using Folch partition. The content of diene and triene conjugates was assessed by means of spectrophotometry. The level of Schiff's bases was studied according to fluorescence intensity, malon dialdehyde concentration — according to the intensity of interaction with thiobarbituric acid. Potentiality of substrate oxidation in specimen was assessed using the method of induced chemoluminescence, and the degree of protein oxidative modification was assessed according to the level of carbonyl derivatives with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The investigation of the content of total lipids and total proteins were carried out using "Bio-Test Total Lipids" and "Total Protein-Vital".

Results. The processes of lipid peroxidation of lens membranes are increasing in animals aged 5—12 months and decreasing in the period of 12—24 months. The level of lipid peroxidation in blood plasma has an expressed tendency for increasing in ageing. Over the years, there is the level decrease of carbonyl derivatives of aminoacids of lens proteins and the tendency for the increase of oxidative modification of proteins in blood plasma.

Key words: ageing, lipid oxidation, protein oxidation, lens, blood plasma.

Процессы свободно-радикального окисления тесно связаны с возрастными биохимическими и физиологическими изменениями в организме. Активные формы кислорода, инициирующие данные процессы, участвуют в выполнении ряда физиологических функций [1]. Концентрация радикальных продуктов строго контролируется антиоксидантными системами. Однако в процессе онтогенеза и при развитии патологических состояний активность антиоксидантного звена снижается и радикальные продукты вовлекаются в каскад свободно-радикальных реакций и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Чрезмерная интенсивность свободно-радикального окисления ведет к повреждению мембран, нарушению функций ферментов и структурных белков, накоплению мутаций в геноме, что, в свою очередь, обуславливает необратимые деструктивные изменения в клетках и тканях [2].

Хрусталик глаза обладает рядом особенностей, благодаря которым он является уникальным объектом исследования в контексте биохимии старения, — непрерывный рост в течение всей жизни и отсутствие непосредственного контакта с кровотоком. В результате этого волокна ядра и внутренних слоев хрусталика имеют, по сути, тот же возраст, что и организм в целом. Основную массу хрусталика составляют белки (α -, β - и γ -кристаллины), обеспечивающие надлежащее светопропускание; их доля в общей массе хрусталика варьирует у разных видов (50—90%). Липиды, в свою очередь, являющиеся минорным компонентом хрусталиков у представителей разных видов, их содержание составляет 3—5%. Однако, несмотря на малый удельный вес, значение липидов в процессах роста и созревания волокон, а также функционирования хрусталика в исследованиях двух последних десятилетий в целом оценивается очень высоко [3, 4].

Цель исследования — оценить и сопоставить параметры интенсивности окисления липидов и белков хрусталика и плазмы крови крыс в процессе старения.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 25 крысах-самцах линии Wistar четырех возрастных групп: 5, 12, 24 и 36 мес — при продолжительности жизни крыс 30—40 мес. Работа проводилась в соответствии с требованиями нормативных правовых актов «Об утверждении правил лабораторной практики» (Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г.). Животные содержались в условиях вивария и получали стандартный рацион.

Материалом исследования являлись хрусталики и плазма крови. Наркотизированных животных декапитировали, выделяли хрусталики и кровь. Плазму крови получали центрифугированием при 1500 об./мин. Хрусталики гомогенизировали в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:25 (масса к объему).

Экстракцию и очистку липидов из анализируемого материала проводили методом Folch [5]. Содержание диеновых (ДК) и триеновых (ТК) конъюгатов оценивали спектрофотометрически [6] на спектрофлуориметре СФ-46 (С.-Петербург, 2000). Уровень оснований Шиффа (ОШ) изучали по интенсивности флуоресценции [7], измерения выполнены на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (С.-Петербург, 2009). Уровень малонового диальдегида (МДА) оценивали спектрофотометрически по интенсивности взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой [8] на спектрофотометре СФ-46. Уровень общих липидов определяли с помощью набора Bio-Test Total Lipids (ф. PLIVA-Lachema, Чехия). Уровень первичных и вторичных продуктов окисления липидов выражали в относительных единицах.

Степень окислительной модификации белков оценивали по уровню карбонильных производных в составе окисленных аминокислотных остатков белков, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона [9] на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (С.-Петербург, 2009). Содержание белка определяли с помощью набора «Общий Белок-Витал» (ф. «Витал Диагностикс», С.-Петербург). Степень окислительной модификации выражали в относительных единицах. Потенциальную возможность окисления субстрата в пробах оценивали методом индуцированной хемиллюминесценции с использованием реакции Фентона [10] на приборе БХЛ-6 (Н. Новгород).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica 6.0. Оценку межгрупповых различий проводили по критерию Стьюдента. Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$ [11].

Результаты и обсуждение. В хрусталиках зрелых животных (12 мес) по сравнению с молодыми (5 мес) наблюдается заметная тенденция к возрастанию уровня продуктов ПОЛ (рис. 1). Наиболее значительное изменение их содержания происходит между возрастными группами 12 и 24 мес, в частности отмечено ста-

статистически значимое снижение уровня первичных — ДК и ТК и конечных продуктов окисления — ОШ. Между группами в возрасте 24 и 36 мес отмечается незначительное повышение содержания продуктов липопероксидации. Относительное содержание карбонильных производных белков хрусталика экспериментальных животных с возрастом имеет выраженную тенденцию к снижению (рис. 2).

Преобладание свободно-радикальных процессов в хрусталике у возрастных групп 5 и 12 мес можно объяснить следующими причинами. Во-первых, большей долей растущих слабодифференцированных клеток волокон коры хрусталика по сравнению с окончательно сформированными волокнами ядра хрусталика и, соответственно, сопутствующими росту процессами окисления молекул глицерофосфолипидов, производные которых (диацилглицерин, жирные кислоты) являются внутриклеточными вторичными мессенджерами, тесно вовлеченными в процессы роста клеток. К примеру, диацилглицерин, взаимодействуя с протеинкиназами С и D, участвует в транспорте липидов от аппарата Гольджи к плазматической мембране и, таким образом, вовлечен в клеточный рост [12, 13].

Во-вторых, повышенный уровень продуктов ПОЛ в хрусталике у возрастных групп до 24 мес может быть связан с высоким по сравнению со старческим возрастом относительным содержанием глицерофосфолипидов в мембранах волокон коры и ядра хрусталика, являющихся первоочередными субстратами перексидации [14]. Исследования липидного состава мембран хрусталиков животных и человека показали увеличение содержания сфинго-, дигидросфингомиелина и холестерина в мембранах хрусталиков у возрастных представителей разных видов млекопитающих [5, 14]. Установлено, что сфингомиелины и холестерин эффективно препятствуют процессам латерального транспорта кислорода по мембранам и окисления ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов [15, 16]. Полученные нами данные позволяют предположить, что процессы свободно-радикального окисления могут не только напрямую участвовать в изменении структуры и свойств мембран хрусталика, но также инициировать адаптационные

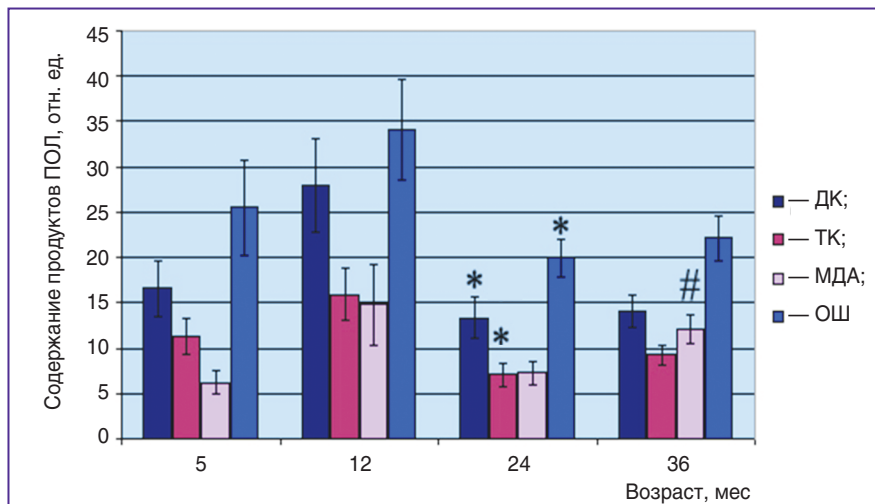


Рис. 1. Продукты окисления липидов в хрусталиках крыс; * — статистически значимые различия между группами 12 и 24 мес, # — между группами 24 и 36 мес

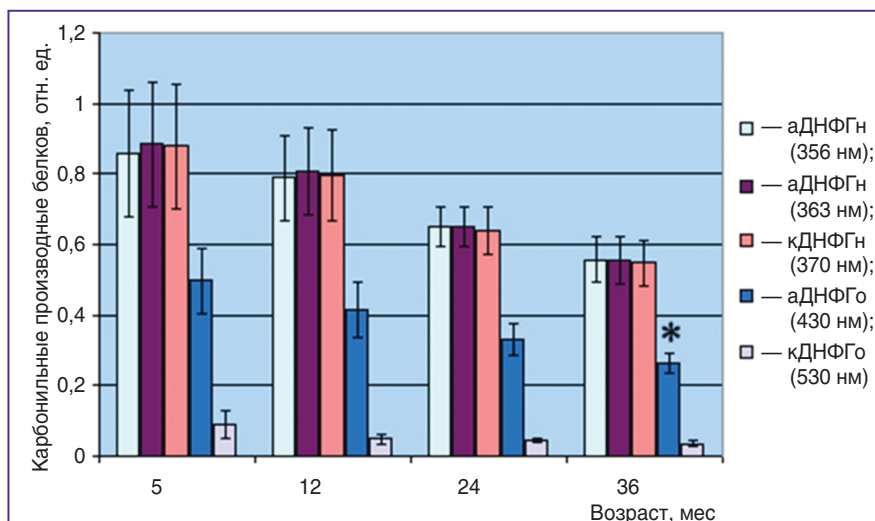


Рис. 2. Уровень карбонильных производных белков хрусталика крыс: aDNFGn, kDNFGn, aDNFGo, kDNFGo — альдегид- и кетондинитрофенилгидразоны нейтрального и основного характера; * — статистически значимые различия между группами 5 и 36 мес

механизмы, препятствующие реализации свободно-радикальных реакций.

Снижение с возрастом уровня карбонильных производных белков хрусталика можно объяснить особенностями окислительных процессов в хрусталике и в организме в целом. Вероятно, процессы, приводящие к накоплению карбонильных производных белков хрусталика, с возрастом ослабевают, уступая роль другим механизмам. Известно, что основными механизмами деградации/денатурации белков хрусталика являются дезаминирование, фрагментация, рацемизация, окисление сульфгидрильных групп [17—19].

Динамика накопления продуктов ПОЛ в плазме крови животных характеризуется возрастанием их относительного содержания до максимальных уровней, наблюдавшихся в возрасте 24 и 36 мес (рис. 3). В плане возрастных изменений уровня карбонильных произ-

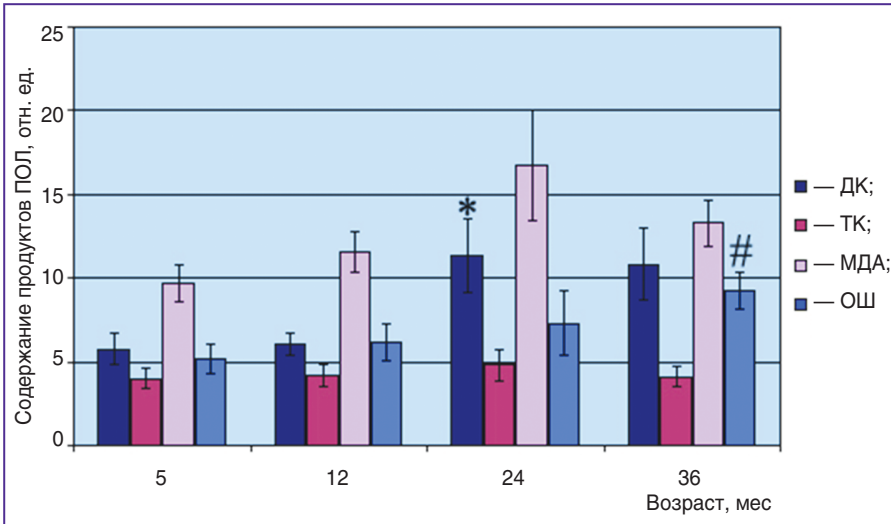


Рис. 3. Продукты окисления липидов в плазме крови крыс; * — статистически значимые различия между группами 12 и 24 мес, # — между группами 5 и 36 мес

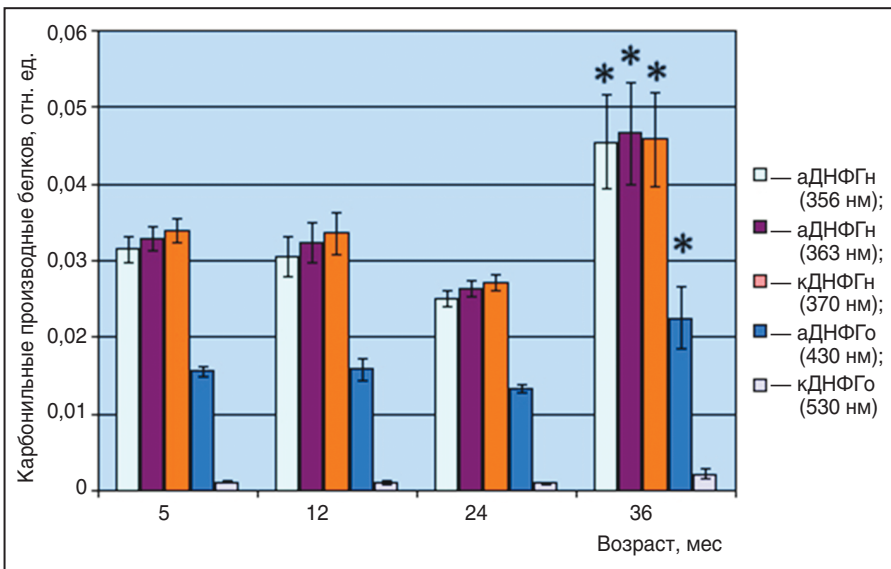


Рис. 4. Уровень карбонильных производных белков плазмы крови крыс; * — статистически значимые различия группы 36 мес от групп 5 и 24 мес

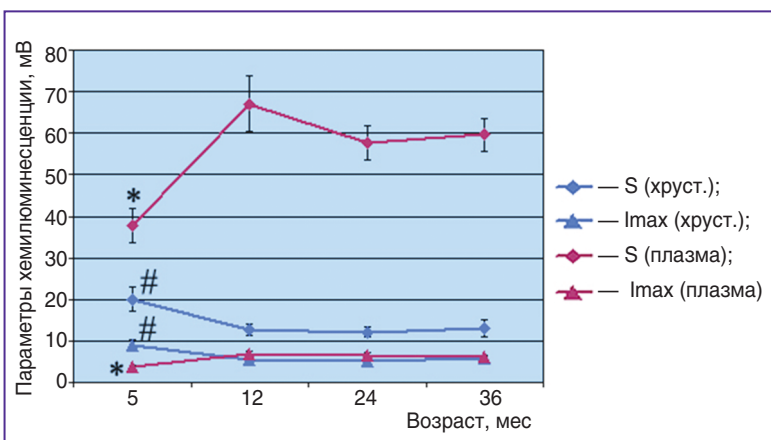


Рис. 5. Параметры индуцированной хемилюминесценции проб хрусталика и плазмы крови крыс за 30 с; * — статистически значимые различия группы 5 мес от групп 12, 24 и 36 мес, # — группы 5 мес от групп 12 и 24 мес

водных белков плазмы наблюдается схожая тенденция: отмечено накопление данных окислительных модификаций у животных в возрасте 36 мес по сравнению с остальными группами (рис. 4).

Накопление с возрастом в плазме крови крыс продуктов липопероксидации и протеинов, имеющих в своем составе излишние карбонильные группировки, может быть связано с ослаблением работы систем антиоксидантной защиты, смещением равновесия в сторону преобладания катаболических процессов над анаболическими и может указывать на снижение функциональной активности систем, которые элиминируют токсичные продукты метаболизма.

При сравнении параметров индуцированной хемилюминесценции хрусталиков и плазмы крови экспериментальных животных (рис. 5) у групп в возрасте 12, 24 и 36 мес по сравнению с группой 5 мес в ткани хрусталика отмечено снижение значений светосуммы (S) и пика люминесценции (I_{max}), что соответствует снижению уровня субстратов, способных подвергаться свободно-радикальному окислению. В плазме крови, напротив, в старших возрастных группах отмечен более высокий уровень индуцированной хемилюминесценции по сравнению с животными в возрасте 5 мес.

Наблюдаемые отличия могут быть обусловлены тем, что с возрастом в хрусталиках накапливаются белковые агрегаты и ригидные комплексы липидов мембран и белков [20], которые стерически препятствуют взаимодействию радикалов, генерируемых в реакции Фентона, со своими потенциальными мишенями.

Среди возможных механизмов, объясняющих возрастное снижение уровня индуцированной хемилюминесценции ткани хрусталика, следует также упомянуть увеличение доли холестерина и сфингомиелинов, эффективно препятствующих распространению цепей радикальных реакций [16]. В связи с этим несомненный интерес представляют исследования, касающиеся возрастных изменений липидного состава мембран хрусталиков, обуславливающих изменения их физико-

химических свойств, особенности взаимодействия с белками хрусталика и «чувствительность» к свободно-радикальным процессам.

Заключение. Процессы пероксидации липидов мембран хрусталика возрастают у животных в возрасте 5—12 мес и снижаются в период 12—24 мес, тогда как содержание продуктов липопероксидации в плазме крови имеет выраженную тенденцию к увеличению. С возрастом наблюдается снижение относительного количества карбонильных производных белков хрусталика параллельно с накоплением данных модификаций в плазме крови у животных в возрасте 36 мес. Характер возрастных изменений параметров индуцированной хемилюминесценции проб хрусталика и плазмы крови крыс заметно отличается: в хрусталике наблюдается снижение уровня потенциально окисляемых субстратов, тогда как в плазме отмечена обратная тенденция.

На основании приведенных предварительных данных можно предположить, что среди изученных в работе показателей окислительных процессов плазмы крови отсутствуют маркеры, характеризующие интенсивность и направленность свободно-радикальных процессов в ткани хрусталика.

Литература

1. *Dröge W.* Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47—95.
2. *Harman D.* Free-radical theory of aging: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 717: 257—266.
3. *Grami V., Marrero Y., Huang L., Tang D., Yappert M.C., Borchman D.* α -Crystallin binding in vitro to clear human lenses. *Exp Eye Res* 2005; 81: 138—146.
4. *Yappert M.C., Borchman D.* Sphingolipids in human lens membranes: an update on their composition and possible biological implications. *Chem Phys Lipids* 2004; 129: 1—20.
5. *Folch P.J., Lees M., Stanley G.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497—509.
6. *Shenstone F.S.* Ultraviolet and visible spectroscopy of lipids. NY; 1971.
7. *Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel A.Y.* Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues. *Analyt Biochem* 1973; 52: 497—499.
8. *Smith J.B., Ingerman C.M., Silver M.J.* Malondialdehyde formation as an indication of prostaglandin production by human platelets. *Lab Clin Med* 1976; 88(1): 167—172.
9. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии* 1995; 41(1): 24—26.
10. *Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенников М.К.* Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: *Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов.* Горький; 1983; 179—183.
11. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М: Практика; 1998; 459 с.
12. *Voet D., Voet J.G.* Biochemistry. NY: Wiley; 1995.
13. *Waldron R.T., Rozengurt E.* Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 2000; 275: 17114—17121.
14. *Yappert M.C., Rujoi M., Borchman D., Vorobyov I., Estrada R.* Glycero-versus sphingo-phospholipids: correlations with human and non-human mammalian lens growth. *Exp Eye Res* 2003; 76: 725—734.
15. *Raguz M., Widomska J., Dillon J., Gaillard E.R., Subczynski W.K.* Characterization of lipid domains in reconstituted porcine lens membranes using EPR spin-labeling approaches. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1079—1090.
16. *Oborina E.M., Yappert M.C.* Effect of sphingomyelin versus dipalmitoyl-phosphatidylcholine on the extent of lipid oxidation. *Chem Phys Lipids* 2003; 123: 223—232.
17. *Wilmarth P.A., Tanner S., Dasari S.* Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of posttranslational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? *J Proteome Res* 2006; 5: 2554—2564.
18. *Hains P.G., Truscott R.J.W.* Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged and cataract human lenses. *J Proteome Res* 2007; 6: 3935—3943.
19. *Fujii N., Ishibashi Y., Satoh K.* Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha B-crystallin from the aged human lens. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204: 157—163.
20. *Friedrich M.G., Truscott R.J.W.* Membrane association of proteins in the aging human lens: profound changes takes place in the fifth decade of life. *IOVS* 2009; 50: 4786—4793.