

## **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОДУЛЯЦИИ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ МИОКАРДА КРЫС ВОЗНИКАЮЩИМИ ПРИ СТРЕССЕ ФАКТОРАМИ**

**Е. Р. Грабовецкая, В. В. Давыдов\***

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, 61077 Харьков

\*Государственное учреждение "Институт охраны здоровья детей и подростков  
АМН Украины", 61153 Харьков

Для выявления причин возрастного изменения чувствительности сердца к действию повреждающих факторов стресса в опытах на 28 крысах-самцах линии Вистар разного возраста проведено сравнительное изучение особенностей сдвигов глутатионтрансферазной активности постмитохондриальной фракции сердца под влиянием снижения pH и содержания восстановленного глутатиона, а также повышения уровня глутарового альдегида и  $H_2O_2$ . Показано, что с возрастом происходит постепенное повышение глутатионтрансферазной активности, которое сопровождается изменениями чувствительности фермента к ингибирующему влиянию ацидоза, глутарового альдегида и к снижению концентрации восстановленного глутатиона в среде инкубации.

**Ключевые слова:** глутатионтрансфераза, постмитохондриальная фракция миокарда, стресс, старение.

Исследованиями разных авторов было установлено, что в процессе индивидуального развития меняется чувствительность сердца к стрессу [4,14]. Однако механизм этого феномена до настоящего времени окончательно не изучен. Можно предположить, что в его основе лежит изменение функционирования ферментных систем, обеспечивающих защиту миокарда от

воздействия повреждающих факторов стресса. К подобным системам относится ферментативная система утилизации карбонильных продуктов [8], интенсивность образования которых возрастает в условиях стрессорной стимуляции свободнорадикальных процессов [14,15].

Основным путем катаболизма карбонильных продуктов обмена в клетках является их конъюгация с глутатионом в глутатионтрансферазной реакции [9]. Однако исследованию свойств глутатион-S-трансферазы в миокарде в процессе восходящего онтогенеза до настоящего времени не уделялось должного внимания. Детальное их изучение позволит оценить вклад данного фермента в возрастное изменение чувствительности сердца к стрессу и формирование возрастной патологии. Учитывая это, целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение особенностей модуляции глутатионтрансферазной активности в сердце крыс разного возраста под влиянием разных факторов.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 28 крысах-самцах линии Вистар четырех возрастных групп: 1—1,5-месячные (ранний пубертат), 2—2-месячные (поздний пубертат), 3—12-месячные (взрослые половозрелые) и 4—24-месячные (старые).

Эвтаназию проводили под легким эфирным наркозом. Извлекали сердце и помещали в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Миокард отмывали от крови, измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма в соотношении 1:10 (масса/объем) с раствором, содержащим сахарозу (0,25 моль/л) и Трис (0,01 моль/л, pH 7,4). Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 20 мин при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры проводили при 4—6 °C.

В постмитохондриальной фракции миокарда определяли активность глутатион-S-трансферазы [КФ 2.5.1.18.] [12]. Для этой цели 0,05 мл суспензии постмитохондриальной фракции вносили в спектрофотометрическую кювету с реакционной смесью, содержащей (конечные концентрации, моль/л) калий-фосфатный буфер (0,1, pH 6,5), динитрохлорбензол (0,001) и восстановленный глутатион (0,005). Скорость реакции измеряли при 340 нм на спектрофотометре СФ—46.

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури.

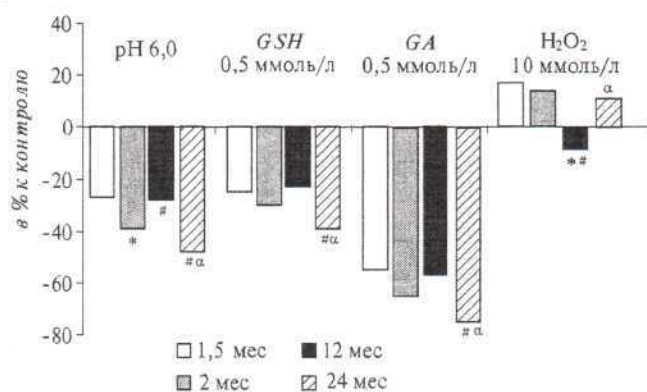
Результаты исследований статистически обрабатывали с использованием непараметрического метода Вилкоксона — Манна — Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования показали, что глутатионтрансферазная активность постмитохондриальной фракции миокарда с возрастом постепенно повышается и достигает максимальной величины у 24-месячных крыс. В основе этого может лежать изменение регуляторных свойств данного фермента, в связи с чем было

проведено исследование влияния некоторых регуляторов на активность глутатионтрансферазы сердца крыс разного возраста. Особый интерес в этом плане приобретает оценка эффекта регуляторных факторов, возникающих в миокарде в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов [1,7], сопровождающейся повышением концентрации активных форм кислорода и накоплением карбонильных продуктов обмена (альдегидов) [2,6], а также в условиях снижения содержания восстановленного глутатиона [3,13] и ацидоза [1], которые возникают при стрессорном воздействии на организм. В связи с этим было проведено изучение глутатионтрансферазной активности постмитохондриальной фракции миокарда в реакционной смеси с уменьшенной концентрацией восстановленного глутатиона, сниженной рН, а также с добавлением в нее перекиси водорода и глutarового альдегида.

При снижении рН среды инкубации, а также уменьшении в ней концентрации восстановленного глутатиона и внесении в нее глutarового альдегида происходит выраженное снижение глутатионтрансферазной активности (таблица, рисунок). Максимальное проявление ингибирующего эффекта сопровождает внесение в реакционную смесь глutarового альдегида. Его причиной может быть ковалентная модификация полипептидной цепи за счет образования аддуктов типа шиффовых оснований при взаимодействии альдегида с включенными в ее состав лизиновыми остатками.

Проявление ингибирующего влияния альдегида на глутатионтрансферазную активность зависит от возраста животных. В максимальной мере оно выражено у старых крыс (см. рис.). У животных 1,5- и 12-месячного



Влияние различных факторов, возникающих при стрессе, на глутатионтрансферазную активность постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста (6 животных в каждой группе); \* —  $P < 0,05$  по сравнению с 1,5-месячными, # —  $P < 0,05$  по сравнению с 2-месячными, α —  $P < 0,05$  по сравнению с 12-месячными.

Таблица

Изменения глутатионтрансферазной активности постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста при модификации инкубационной среды, нмоль/(мин·мг белка)

Условия инкубации	1,5 мес	2 мес	12 мес	24 мес
Контроль (инкубационная среда)	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2 <sup>#</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>#а</sup>	6,1 ± 0,7 <sup>#аб</sup>
pH 6,0	1,2 ± 0,1 <sup>*</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>*</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>*а</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>*аб</sup>
GSH, 0,5 ммоль/л	1,3 ± 0,1 <sup>*</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>*</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>*а</sup>	3,7 ± 1,0 <sup>*аб</sup>
GA, 0,5 ммоль/л	0,77 ± 0,05 <sup>*</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>*</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>*а</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>*а</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 10 ммоль/л	2,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1 <sup>#</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>#</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>#аб</sup>

Примечания: GSH — восстановленный глутатион, GA — глутаровый альдегид; \* —  $P < 0,05$  по сравнению с контролем данной возрастной группы, # —  $P < 0,05$  по сравнению с 1,5-месячными, а —  $P < 0,05$  по сравнению с 2-месячными, б —  $P < 0,05$  по сравнению с 12-месячными.

возраста проявление ингибирующего влияния глутарового альдегида на глутатионтрансферазную активность имеет сходную величину и выражено в меньшей мере, чем у крыс других возрастных групп.

Глутатионтрансферазная активность постмитохондриальной фракции миокарда старых крыс проявляет большую, чем у животных других возрастных групп, чувствительность к ингибирующему влиянию ацидоза, а также к снижению в реакционной смеси концентрации восстановленного глутатиона (см. рис.). Обращает на себя внимание тот факт, что фермент из миокарда 1,5- и 12-месячных крыс обладает сравнительно большей устойчивостью к действию указанных факторов, чем у животных других возрастных групп.

Перекись водорода оказывает слабое активирующее влияние на глутатионтрансферазную активность постмитохондриальной фракции миокарда. Вместе с тем, этот эффект проявляется только у крыс пубертатного возраста (1,5 и 2 мес).

Таким образом, при старении происходит постепенное повышение глутатионтрансферазной активности в цитозоле миокардиальных клеток, которое сопровождается изменением лабильности фермента к действию регуляторных факторов. Наибольшую чувствительность к ингибирующему влиянию ацидоза и внесению в реакционную смесь глутарового альдегида, а также к снижению концентрации субстрата (восстановленного глутатиона) проявляет фермент из миокарда старых крыс. Кроме того, он утрачивает способность к активации под влиянием перекиси водорода. Учитывая это и принимая во внимание тот факт, что при старении в тканях внутренних органов происходят метаболические сдвиги, напоминающие таковые при стрессе (активация ПОЛ, истощение низкомолекулярных антиоксидантов, ацидоз), можно предположить возникновение в позднем онтогенезе предпосылок для ограничения в сердце скорости утили-

зации цитотоксических карбонильных продуктов обмена путем их конъюгации с глутатионом. Параллельное повышение глутатионтрансферазной активности цитозоля миокардиальных клеток, по всей вероятности, является проявлением компенсаторной реакции, направленной на ограничение негативных последствий накопления в сердце данных метаболитов. В ее основе может лежать возрастное изменение изоферментного спектра глутатионтрансферазы цитозоля за счет изменения экспрессии генов, кодирующих структуру представителей семейства этого фермента в позднем онтогенезе.

С изменением изоферментного спектра глутатионтрансферазы можно связать и модуляцию силы регуляторных воздействий на фермент у животных разных возрастных групп. Особого внимания при этом заслуживают сдвиги регуляторных свойств фермента, возникающие в возрасте позднего пубертата (2-мес). Схожесть в силе проявления регуляторных воздействий на глутатионтрансферазную активность постмитохондриальной фракции миокарда у этих и старых крыс можно объяснить характерными для этих возрастных периодов сдвигами эндокринной регуляции ввиду участия гормонов в контроле экспрессии генов ферментов, участвующих в катаболизме карбонильных продуктов обмена [5, 10].

Возрастные особенности регуляции глутатионтрансферазной активности постмитохондриальной фракции миокарда способствуют ограничению скорости утилизации цитотоксических карбонильных продуктов метаболизма в миокарде при стрессе в позднем пубертате и у старых животных. Однако особенностями реализации данного сдвига в изменении устойчивости сердца к действию повреждающих факторов стресса в эти периоды развития требуют проведения специальных исследований.

Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Украины (грант М/348-2008).

### Литература

1. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 270 с.
2. *Меньшиков Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
3. *Руденко В. В., Голобородько А. В., Редько А. В., Давыдов В. В.* Особенности изменения содержания глутатиона в мозге крыс при иммобилизационном стрессе // Укр. биохим. журн. — 2008. — **80**, № 1. — С. 100–103.
4. *Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К.* Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. — Киев: Наук. думка, 1994. — 320 с.
5. *Castellón E. A.* Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells // Internat. J. Androl. — 2001. — **22**, № 1. — P. 49–55.
6. *Comporti M.* Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology // Free Radic. Res. — 1998. — **28**, № 6. — P. 623–635.

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. — **38**, № 6. — P. 693–698.
8. Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. N. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging // *Exp. Gerontol.* — 2004. — **39**, № 1. — P. 11–16.
9. Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Radic. Biol. Med.* — 1991. — **11**, № 1. — P. 81–128.
10. Grant A., Staffas L., Mancowitz L. et al. Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1: influence of age and sex and tissue-specific inducibility // *Biochem. Pharmacol.* — 2001. — **62**, № 11. — P. 1511–1519.
11. Lakatta E. G. Heart aging: a fly in the ointment // *Circ. Res.* — 2001. — **88**. — P. 984–986.
12. Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione transferase. // *Methods Enzymology.* — 1981. — **77**. — P. 231–235.
13. Ozer M. K., Parlakpinar H., Cigremis Y. et al. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? // *Mol. Cell. Biochem.* — 2005. — **273**, № 1-2. — P. 169–175.
14. Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases // *Exp. Gerontol.* — 2001. — **36**, № 9. — P. 1425–1457.
15. Uchida K. Role of reactive aldehydes in cardiovascular disease // *Free Radic. Biol. Med.* — 2000. — **28**, № 12. — P. 1685–1696.

Поступила 04.11.2008.

# **AGE-DEPENDENT PECULIARITIES IN MODULATION OF GLUTATHIONE TRANSFERASE ACTIVITY IN THE POST-MITOCHONDRIAL FRACTION OF THE RAT'S MYOCARDIUM**

E. R. Grabovetskaya, V. V. Davydov\*

V. N. Karazin National University, 61077 Kharkov

\*State Institution "Institute of Children and Adolescent  
Health AMS Ukraine", 61153 Kharkov

Comparative study of the peculiarities in modulation of glutathione transferase activity in the post-mitochondrial fraction of the myocardium of 28 male Wistar rats of various age was made following decrease of pH and of the content of reduced glutathione and increase of the level of glutaraldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to find out the reasons for an age-related change in the heart sensitivity to the effects of damaging stress factors. The results obtained an age-related gradual increase of glutathione transferase activity, accompanied with changes in the sensitivity of the enzyme to the inhibitory effect of acidosis and of glutaraldehyde and to the decrease in concentration of the reduced glutathione in the incubation medium.