

УДК 557.352.38
©Коллектив авторов

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛЕННОСТИ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS

Н.Г.Колосова^{1,1}, А.Ю.Гришанова², Ж.С. Крысанова¹, Т.В. Зуева², Ю.А.Сидорова²,
О.И. Сеницина¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, ул. Лаврентьева, 10;

²НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН, 630117,

Новосибирск, ул. Тимакова, 2;

¹НИИ физиологии СО РАН, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2а;

эл. почта: N.G.Kolosova@iph.ma.nsc.ru

Исследовали возрастные изменения содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительных повреждений белков в митохондриях и микросомах печени преждевременно стареющих крыс OXYS в сравнении с соответствующими показателями крыс Вистар. В течение первого года жизни в митохондриях и микросомах печени клеток печени крыс обеих линий наблюдаются нелинейные разнонаправленные изменения содержания продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов. К 12 месяцам в митохондриях и цитозоле клеток печени у крыс OXYS уровень окислительных повреждений белков выше, чем у Вистар. При этом повышенное содержание продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов - наблюдалось только в митохондриях, в то время как в микросомах печени крыс OXYS содержание и первичных, и конечных продуктов ПОЛ к 12 месяцам существенно снижалось.

Ключевые слова: окисление, белки, липиды, старение, крысы OXYS

ВВЕДЕНИЕ. Наследственно повышенная генерация радикалов кислорода в тканях крыс линии OXYS рассматривалась как ключевая характеристика при регистрации линии [1]. Предполагается, что данное свойство лежит в основе патогенеза преждевременного старения этих животных и развития у них хронических возрастных патологий, включая катаракты, кардиомиопатии и нарушения когнитивных функций мозга [2-5]. Максимальная продолжительность жизни крыс OXYS снижена, по сравнению с Вистар, на 28% и составляет 24,6±4,0 месяца. Хорошо известно, что причиной роста радикалообразования и, как следствие, старения, могут становиться нарушения функций митохондрий, связанные с их генетическими и метаболическими дефектами [6]. Поэтому как наиболее вероятная причина развития внутриклеточного окислительного стресса рассматривались характерные для крыс OXYS нарушения в электронтранспортной цепи митохондрий [7]. Однако хемилюминесцентный анализ показал, что генерация активных форм кислорода (АФК) ферментативными системами митохондрий печени крыс OXYS даже ниже, чем у Вистар [8]. Другим потенциальным источником АФК в клетках печени может быть монооксигеназная система. Но при её стимуляции признаков активации свободнорадикальных процессов в микросомах печени крыс OXYS не наблюдается [9]. Такие результаты

представляются неожиданными, поскольку участие свободных радикалов в изменениях, ведущих к старению клеток и тканей организма, сомнений не вызывает [10].

В настоящей работе для выяснения вопроса о связи преждевременного старения крыс ОХУС с активностью свободнорадикальных процессов были исследованы возрастные изменения содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительных повреждений белков в различных компартментах клеток печени этих животных в сравнении с соответствующими показателями у крыс Вистар.

МЕТОДИКА. Работа проведена на крысах-самцах линий Вистар и ОХУС (лаборатория разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск) в возрасте 3, 6 и 12 месяцев. Микросомы и митохондрии печени выделяли стандартными методами дифференциального центрифугирования. Содержание белка определяли методом Лоури [11]. В экстрактах липидов, полученных из микросом и митохондрий печени по методу [12] с добавлением 0,001% ионола, определяли содержание диеновых конъюгатов и флуоресцирующих продуктов ПОЛ - оснований Шиффа, в микросомах исследовали также содержание малонового диальдегида (МДА) [13].

Об окислительных повреждениях белков в митохондриях и цитозольной фракции печени крыс судили по содержанию карбонильных групп, которое оценивали спектрофотометрическим методом в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [14].

Результаты обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как показали исследования, возрастные изменения содержания продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в различных структурах клеток печени крыс неодинаковы.

Данные о содержании карбонильных групп (показателе окислительного повреждения белков) в митохондриях и цитозоле клеток печени представлены на рисунке 1. У крыс обеих линий этот показатель в митохондриях наиболее высок в 3 месяца, но у крыс ОХУС содержание карбонильных групп в этом возрасте существенно ниже, чем у Вистар (рис. 1а). К 6 месяцам содержание карбонильных групп в митохондриях снижается, а межлинейная разница исчезает. К 12 месяцам показатель возрастает у крыс Вистар в 1,4 раза, у ОХУС - в 1,8 и становится у последних на 20% выше, чем у Вистар ($p < 0,05$). Содержание карбонильных групп в цитозоле клеток печени (рис. 1б) 3-месячных крыс ОХУС и Вистар одинаково, но оно существенно ниже, чем в митохондриях: в 1,8 и в 2,8 раза, соответственно ($p < 0,01$). К 6 месяцам их содержание в цитозоле несколько возрастает и по

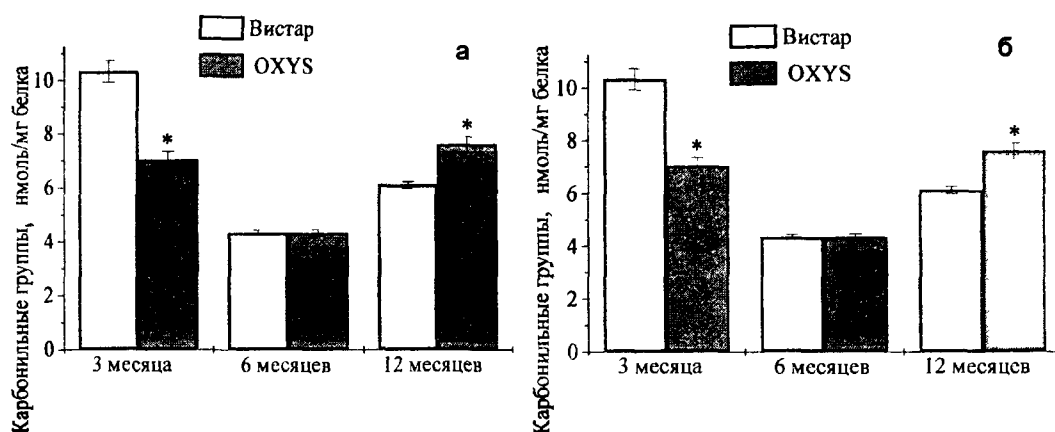


Рисунок 1.

Содержание карбонильных групп в белках митохондрий (а) и цитозоля (б) печени крыс Вистар и ОХУС разного возраста.

значениям становится таким же, как в митохондриях, однако межлинейные различия по-прежнему отсутствуют. К 12 месяцам показатель снижается по сравнению с 6-месячными животными: у крыс Вистар в 1,5 ($p < 0,01$), у OXYS - в 1,2 раза ($p < 0,05$). И только в этом возрасте содержание карбонильных групп у крыс OXYS становится на 23% выше, чем у Вистар ($p < 0,05$).

На рисунках 2 и 3 представлены данные о возрастных изменениях активности ПОЛ в митохондриях и микросомах крыс Вистар и OXYS. Исследование 3- и 6-месячных животных не выявило ни возрастных, ни межлинейных различий по содержанию первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов (рис. 2 а). К 12 месяцам их содержание у крыс OXYS возрастает и становится на 15% выше, чем у Вистар ($p = 0,04$).

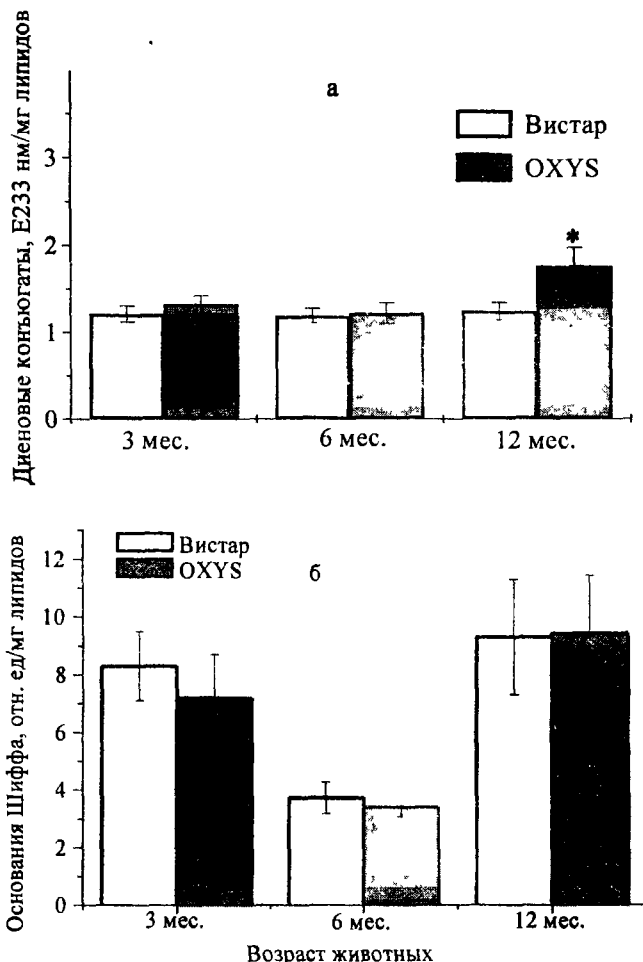


Рисунок 2.

Возрастные изменения содержания продуктов ПОЛ в митохондриях печени крыс Вистар и OXYS: (а) - содержание диеновых конъюгатов, (б) - содержание оснований Шиффа.

Содержание в митохондриях флуоресцирующих продуктов ПОЛ - оснований Шиффа (рис. 2б) - изменялось с возрастом подобно тому, как менялось содержание карбонильных групп в белках: минимальный уровень регистрировался в 6 мес., а между 3- и 12-месячными животными различия отсутствовали. Межлинейные различия по этому показателю в митохондриях выявить не удалось.

Иная картина наблюдалась при анализе изменений активности ПОЛ в микросомах печени. С возрастом у крыс обеих линий отчетливо снижалось

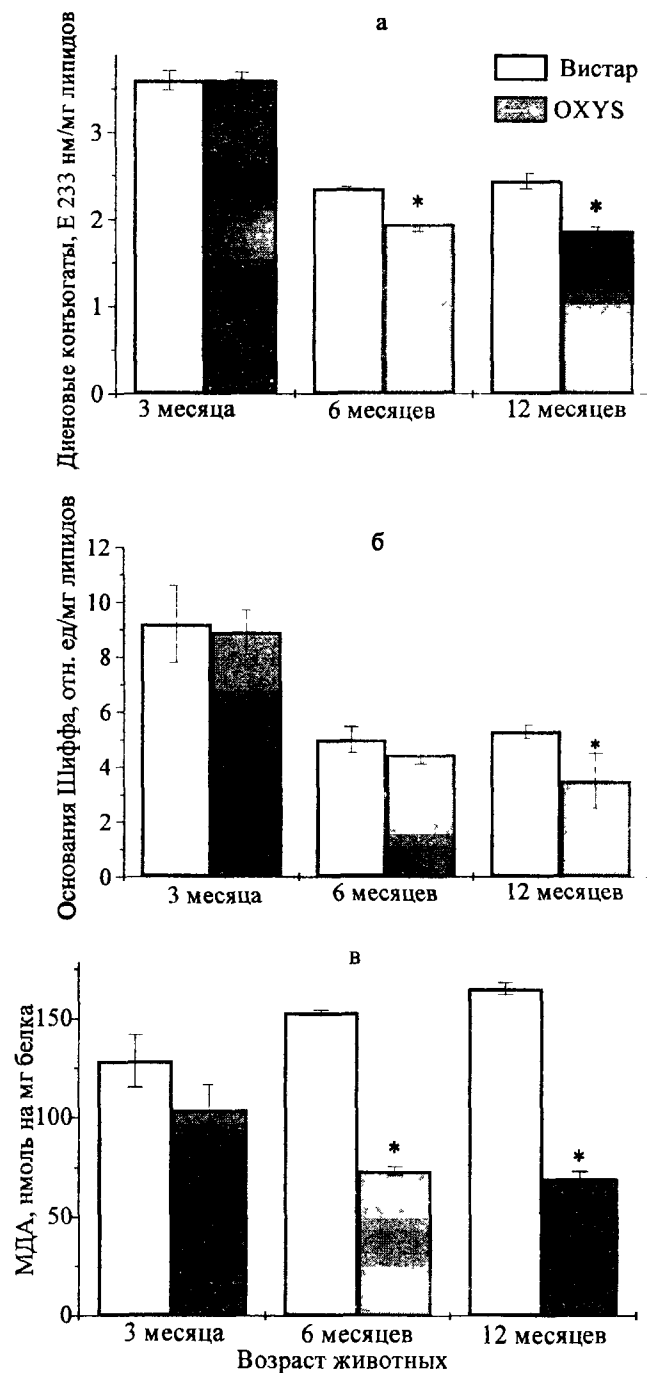


Рисунок 3.

Возрастные изменения содержания продуктов ПОЛ в микросомах печени крыс Вистар и OXYS: (а) - содержание диеновых конъюгатов, (б) - содержание оснований Шиффа, (в) - содержание МДА

содержание как диеновых конъюгатов (рис. 3 а), так и оснований Шиффа (рис.3б), причем содержание диеновых конъюгатов в микросомах 6- и 12-месячных крыс OXYS было достоверно ниже, чем у Вистар. Содержание конечного продукта ПОЛ - МДА (рис.3 в), в микросомах крыс OXYS этого возраста также ниже, чем у Вистар. Однако если у крыс Вистар в 12 месяцев оно выше, чем в 3, то у OXYS таких возрастных изменений этого показателя мы не наблюдали.

Таким образом, в течение первого года жизни в различных компартментах клеток печени крыс обеих линий наблюдаются нелинейные разнонаправленные изменения содержания продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов. В возрасте 12 месяцев у крыс OXYS уровень окислительных повреждений белков выше, чем у Вистар и в митохондриях, и в цитозоле клеток печени. При этом повышенное содержание продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов - наблюдалось только в митохондриях, в то время как в микросомах печени крыс OXYS содержание первичных и конечных продуктов ПОЛ к 12 месяцам существенно снижалось.

По данным Tian et al. [15], накопление окислительных повреждений белков в тканях - функция биологического возраста организма, однако статистически значимое повышение содержания карбонильных групп в гомогенате печени авторы регистрировали только у 24-месячных крыс Fisher 344, а увеличения продуктов ПОЛ не наблюдали и у старых животных. Выявленные нами различия в характере изменений окислительных повреждений белков митохондрий и цитозоля, продуктов ПОЛ в митохондриях и микросомах печени крыс Вистар и OXYS свидетельствуют о том, что в случае исследования гомогената печени их колебания в течение первого года жизни могли остаться незамеченными.

В большинстве соматических клеток митохондрии - основной источник АФК [16]. Очевидно, этим и обусловлено то, что уровень окислительных повреждений белков митохондрий выше, чем в цитозоле. Примечательно, что максимальное содержание карбонильных групп и конечных продуктов ПОЛ - оснований Шиффа - в митохондриях печени крыс обеих линий наблюдалось в 3 месяца, т.е. у интенсивно растущих животных, самое низкое - в 6 месяцев, в период "стабилизации роста". Такие результаты соответствуют данным литературы о том, что, с одной стороны, АФК могут активировать клеточную пролиферацию, а с другой - скорость их генерации в пролиферирующем органе растет [17].

Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что если за точку отсчёта брать полугодовалых животных, то связанный с возрастом рост содержания продуктов окислительной модификации белков и липидов в митохондриях печени наблюдается уже к 12 месяцам. Более низкое, по сравнению с Вистар, содержание карбонильных групп в митохондриях 3-месячных крыс OXYS, возможно, обусловлено снижением скорости протребления кислорода и ферментативной генерации АФК в них [8]. Митохондрии печени 12-месячных крыс OXYS также генерируют меньше АФК [8], но содержание окисленных белков в них выше, чем у крыс Вистар. Как было показано ранее, изменения структуры и функций митохондрий печени регистрируются уже у молодых крыс OXYS, однако они компенсируются и снижения синтеза АТР не происходит [7]. С возрастом нарушения в митохондриях нарастают, развивается энергетический дефицит, одним из последствий которого и становится накопление окислительных повреждений белков и липидов. Мы не исследовали ферментативную генерацию АФК в микросомах печени. Однако в литературе есть сообщения о том, что к старости она падает в 2 раза [18]. Возможно, с этим и связано практически линейное снижение содержания продуктов ПОЛ в микросомах крыс обеих линий с возрастом, причем у крыс OXYS - более значительное.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №99-04-49744).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rat genome*. (1996) 2(2), 52 - 54.
2. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. (1975) Генетика, **11**(5), 63 - 71.
3. Salganik R. I, Solovyova N. A., Dikalov S. I. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., **199**, 726 -733.
4. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Постникова О.А., Циммерман В.Г. (1999) Бюлл. эксперим. биол. мед., **128**(8), 233-237.
5. Лоскутова Л.В., Колосова Н.Г. (2000) Бюл. экспер. биол. **130**(8), 155 - 158.
6. Fosslien E. (2001) Ann. Clin. Lab. Sci., **31**(1), 25-67
7. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю. и др. (1995) Биохимия, **60**, 2045-2052.
8. Меньщикова Е.Б., Шабалина И.Г., Зенков Н.К. и др. (2000) Бюлл. СО РАМН, №3-4, 43-49.
9. Зуева Т.В., Гришанова А.Ю., Колосова Н.Г. (2001) Бюл. экспер. биол. мед., **131**, приложение 1, 26-29.
10. Floyd RA, West M, Hensley K. (2001) Exp. Gerontol., **36**(4-6), 619-640.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
12. Lu A.Y.H., Levin W. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 1334-1339.
13. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. (1986) Итоги науки и техники, серия Биофизика, **18**, 136 с.
14. Reznick A.Z., Packer L. (1994) Methods Enzymol., **233**, 357-363.
15. Tian L, Cai Q, Wei R. (1998) Free Radic Biol Med., **24**(9), 1477-1484.
16. Nickolls D.G., Budd S.L. (2000) Physiological Reviews, **80**(1), 315-352.
17. Вартанян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Лозовская Е.Л., Бурлакова Е.Б. (2000) Биохимия, **65**(4), 522-527.
18. Гуськова Р.А., Виленчик М.М., Кольтовер В.К. (1998) Биофизика, **25**, 102-105.

Поступила 29.06.2002

AGE-DEPENDENT VARIATIONS OF PROTEIN AND LIPID OXIDATION IN LIVER OF PRE-MATURE AGING OXYS RAT

N.G.Kolosova^{1,3}, A.Y.Grishanova², J.S.Krysanova¹, T.V.Zueva², Y.A.Sidirova², O.I.Sinitsyna¹

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 660090, Russia

²Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, 630117, Russia

³ Institute of Physiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, 630117, Russia; e-mail: N.G.Kolosova@iph.ma.nsc.ru

Age-dependent variations in products of lipid peroxidation products (LPO) and oxidative damage of proteins have been studied in the liver mitochondria and microsomes of premature aging OXYS rats. Characteristics of oxidative processes in OXYS rats were compared with parameters in Wistar rats. Changes in lipid peroxidation products content and oxidative damage of proteins in rat liver mitochondria and microsomes of both strains rats were nonlinear and had opposite direction during the first year of life. The level of protein oxidative damage in OXYS rat liver mitochondria and cytosol was higher than in Wistar at 12 months. The content of primary and end lipid peroxidation products in OXYS rat liver microsomes was significantly decreased in 12 months, but content of conjugated dienes was increased in mitochondria.

Key words: oxidation, proteins, lipids, aging, OXYS rats