

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.218

©Коллектив авторов

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЭКСПРЕССИЯ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ И ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ АДРЕНАЛИНОВОМ МИОКАРДИТЕ

И.Ю. Искусных, Т.Н. Попова, О.С. Мушарова*

Воронежский государственный университет, Университетская пл., 394006
Воронеж; факс: 7(4732)208-755; эл. почта: iskusnykh777@mail.ru

Установлена корреляция между изменениями активностей глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) в сердце крыс в динамике развития адренолинового миокардита и интенсивностью свободнорадикальных процессов, оцениваемой с помощью параметров биофлуоресценции и содержания продуктов липопероксидации. Максимальное увеличение активностей ГР и ГП: в 1,8 и 1,4 раз соответственно, наблюдалась к 24 ч развития патологического состояния, что совпадало с наибольшей интенсивностью процессов свободнорадикального окисления. Используя сочетание обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени, проведено количественное определение уровня мРНК генов глутатионпероксидазы (Gpx1) и глутатионредуктазы (Gsr) в сердце крыс к 24ч развития адренолинового миокардита. Анализ экспрессии генов Gpx1 и Gsr позволил установить, что уровень их транскриптов увеличивается при адренолиновом миокардите в 2,8 раза и 7,3 раза соответственно. Очевидно, гиперэкспрессия данных ферментов может способствовать повышению устойчивости кардиомиоцитов к окислительному стрессу.

Ключевые слова: гиперэкспрессия, окислительный стресс, миокардит, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время известно, что ключевым звеном многих патологических процессов является чрезмерное генерирование активных форм кислорода. Как правило, избыток свободных радикалов вызывает структурные и функциональные повреждения биомолекул [1]. В клеточных мембранах происходит формирование каналов проницаемости, что нарушает жизнедеятельность клеток и приводит к их гибели. При нарушении кровообращения в ткани миокарда возникает дисбаланс между энергообеспечением

* - адресат для переписки

сердца и его метаболическими потребностями. Это вызывает снижение уровня высокоэнергетических фосфатов, накопление потенциально токсичных продуктов метаболизма, включая, свободные кислородные радикалы, приводящие к морфологическому повреждению и, в конце концов, к гибели кардиомиоцитов. Важнейшими ферментами глутатионовой антиоксидантной системы организма (АОС), обеспечивающей защиту клеток от свободнорадикального повреждения, являются селенсодержащая глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза [2-4]. При функционировании глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной (ГР/ГП) системы в клетках млекопитающих обеспечивается детоксикация гидроперекисей и перекисей, являющихся основным источником гидроксильного радикала, образующегося в реакции Фентона в присутствии ионов Fe^{2+} [5, 6]. В связи с этим, целью данной работы явилась оценка временной динамики свободнорадикального окисления (СО), активности ГР, ГП и их экспрессии во время максимальной интенсификации СО при адреналиновом миокардите.

МЕТОДИКА. В опыте использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 150–200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животные были разделены на две экспериментальные группы: 1) контроль (n=12); 2) животные с индуцированным адреналиновым миокардитом (n=12).

Адреналиновый миокардит у крыс моделировали введением 0,1% раствора адреналина в дозе 0,15 мл на 100 г массы тела [7]. Контрольным животным вводили соответствующий объём физиологического раствора. Забой животных производили через 6, 12, 18, 24, 30 и 36 часов от момента введения адреналина.

Для получения гомогената навеску сердца крысы гомогенизировали с помощью гомогенизатора Т10 в 4-х кратном объеме охлаждённой среды выделения (0,1 М трис-НСl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол) и центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин.

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы определяли спектрофотометрически при 340 нм. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Активность ферментов выражали в Ед на грамм сырой массы сердца, и в виде удельной активности. Активность ГР определяли в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ окисленного глутатиона (GSSG). Измерение активности ГП проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H_2O_2 , 1 Ед/мл ГР.

Содержание продуктов перекисидного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых конъюгатов - определяли на спектрофотометре Hitachi-U1900 при 233 нм [8].

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности применяли метод индуцированной пероксидом водорода и сульфатом железа биохемиллюминесценции (БХЛ) с помощью биохемиллюминометра БХЛ-007М с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемиллюминесценции (S), интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность СО, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность.

Для оценки уровня экспрессии Gpx1 и Gsr выделяли тотальную РНК из ткани сердца контрольных и опытных животных с использованием набора YellowSolve ("Clonogene", Россия). Степень деградации РНК, оценивали с помощью электрофореза в денатурирующем 1% агарозном геле. Количество РНК определяли на спектрофотометре Hitachi-U1900 по поглощению при длине волны 260 нм. Для реакции обратной транскрипции 5 мкг тотальной РНК

отжигали с 1 мкл случайных гексапраймеров (0,5 мкг/мкл) при 70°C в течение 5 мин. После этого пробирку помещали в лёд и добавляли в следующем порядке: 4мкл 5x-ОТ буфер, 1мкл RiboLock™ (20 мкл/мкл) и 2мкл 10мМ смеси дНТР. Затем осуществляли инкубацию при 37°C в течение 5 мин. Далее добавляли 2 мкл M-MuLV обратной транскриптазы (20 Ед/мкл) до конечного объёма 20 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. По истечении времени реакцию останавливали посредством нагревания при 70°C в течении 10 мин. Полученная в ходе обратной транскрипции кДНК была использована для анализа экспрессии генов Gpx1 и Gsr с помощью ПЦР-РВ. Для нормализации уровня экспрессии исследуемых генов были использованы 3 гена: альбумина (Alb), β-актина (βAct), рибосомального белка L3. Праймеры для всех пяти исследуемых генов были подобраны с помощью программы Genamics Expression (таблица). Для проведения ПЦР использовали набор реактивов с SYBR GreenI фирмы "Синтол" (Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 ("НИИ Аналитического приборостроения РАН, МГТУ им. Баумана", Россия) по следующей схеме: 120 с - 95°C, затем 40 циклов: 15 с - 95°C, 10 с - при температуре отжига праймеров для данного гена (60°C - для Alb, 63°C - для βAct, 68°C - для рибосомного белка L3, 62°C - для Gsr и Gpx1), 30 с - 72°C. Каждый образец ткани был проанализирован трижды для каждого гена. Полученные значения пороговых циклов реакций (Ct) были нормализованы относительно Ct трёх генов "домашнего хозяйства" и статистически обработаны с помощью программного обеспечения "Relative Expression Software Tool (REST)" [9]. При этом изменения экспрессии относительно контрольных проб рассчитывали по схеме: экспрессия = среднее геометрическое ($GOIConc / REFConc1$, $GOIConc / 2REFConc2...$), где GOIConc – концентрация исследуемого гена; REFConc1,2... - концентрация соответствующих референсных генов.

Таблица. Праймеры генов Gpx1, Gsr, Act, Alb, L3, использованных для проведения ПЦР в реальном времени.

Праймер	Последовательность	Источник последовательности в NCBI	Эффективность амплификации, %	T _a , °C
Gpx1 (прямой) Gpx1 (обратный)	AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA TCACCAATTCACCTCGCACTTCTCA	NM_030826.3	86,3	68
Gsr (прямой) Gsr (обратный)	GGAAGTCAACGGGAAGAAGTTCACTG CAATGTAACCGGCACCCACAATAAC	NM_053906.1	91,28	64
βAct (прямой) βAct (обратный)	TGTTTGAGACCTTCAACACC TAGGAGCCAGGGCAGTAATC	NM_031144.2	94,9	63
Alb (прямой) Alb (обратный)	GCAAACTGCAGGCTTGCTGTGATA AAGTCAGCAGCTATTGAGGGCAGA	NM_134326	98,03	60
L3 (прямой) L3 (обратный)	GCATTCATGGGACCGCTCAA AGCTGCACAAAGTACTCCTGGCAT	NM_198753	89,23	68

Значение концентрации исследуемого гена и референсных генов находили по формулам:

$$GOI Conc = \text{эффективность}^{\Delta Ct GOI};$$

$$REF Conc_{1,2...} = \text{эффективность}^{\Delta Ct REF_{1,2...}},$$

где $\Delta Ct GOI$ – разница пороговых циклов контрольных и экспериментальных групп, полученных в ходе амплификации исследуемого гена; $\Delta Ct REF Conc_{1,2...}$ – разница пороговых циклов контрольных и экспериментальных групп, полученных в ходе амплификации соответствующих референсных генов.

Значение эффективности амплификации референсных и исследуемых генов определяли с помощью графика зависимости пороговых циклов от логарифма концентрации кДНК. Для расчета использовали следующую формулу: $E=10^{(-1/A)}$, где E – эффективность амплификации, A – коэффициент перед аргументом линейной функции.

Для повышения точности определения эффективности амплификации при вычислении увеличивали число повторностей для каждого разбавления, при этом каждая точка стандартной кривой представляет собой среднее измерений для трёх одинаковых образцов.

После амплификации с геноспецифическими праймерами ПЦР-продукты были разделены методом электрофореза в 1% агарозном геле. Фрагменты подходящего размера были вырезаны из геля и очищены с использованием набора ALMA-Clean Up ("Альмабион", Россия), согласно протоколу фирмы производителя. ПЦР-продукты секвенировали на автоматическом анализаторе ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer. Полученные последовательности анализировали на специфичность с помощью программы BLAST.

Все данные были обработаны с использованием стандартных статистических методов [10]. С помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007 были рассчитаны коэффициенты корреляции между интенсивностью СО, содержанием диеновых конъюгатов и активностью ГР/ГП системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Динамика свободнорадикального окисления и состояние ГР/ГП АОС были исследованы в ткани сердца крыс в течение 36 ч после индукции адреналинового миокардита. Проведённый анализ давал возможность как выявить быстрые изменения в работе сердца в ответ на введение адреналина, так и проследить за более отдалёнными последствиями его действия.

Исследование спектральных характеристик липидов миокарда, экстрагированных в гептановой фазе, показало увеличение оптической плотности в области 230-268 нм с выраженным пиком при 233 нм, свидетельствующим о наличии в исследуемых пробах конъюгированных диенов и гидропероксидов липидов. В результате проведенных исследований нами было установлено, что при развитии патологии сердечной мышцы происходит увеличение содержания ДК уже через 12 ч после введения адреналина в 3,6 раза. Максимальный уровень ДК, превышающий контрольное значение в 3,7 раза, наблюдался спустя 24 ч после введения данного гормона (рис. 1). На 30-м и 36-м часах развития экспериментального адреналинового миокардита уровень ДК был повышенным в 3,6 раза относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют об активации процессов ПОЛ и накоплении продуктов липопероксидации в ткани сердца животных, подвергнутых экспериментальному адреналиновому миокардиту.

Показано также, что светосумма хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), отражающие интенсивность СО, значительно возрастали, достигая максимума через 24 ч после индукции патологии (рис. 1). S увеличивалась в 1,7 раз, по сравнению с контролем. Значение I_{max} возрастало в сердце в 3,9 раза относительно уровня контрольных значений. Через 24 ч после

индукции патологии сердца наблюдалось повышение величины тангенса угла наклона кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_2$), характеризующего общую антиоксидантную активность, в 3,3 раза по сравнению с нормой. Это позволяет заключить, что в условиях патологии начинают действовать компенсаторные механизмы, направленные на снижение уровня СО в клетке.

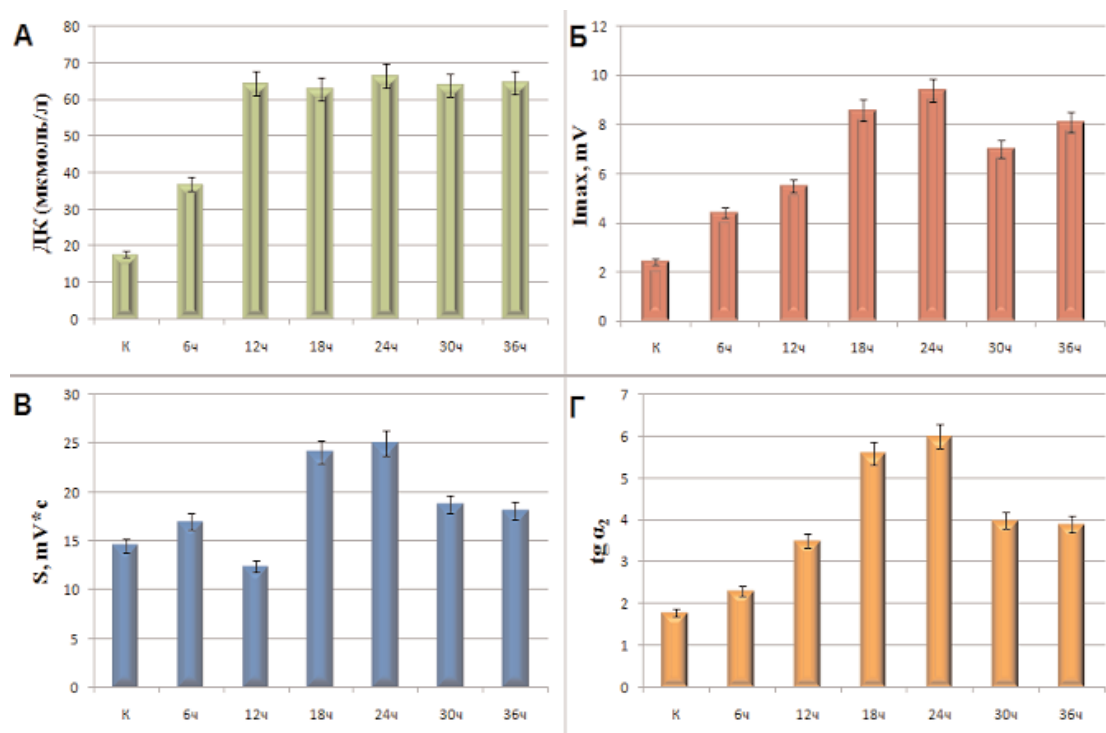


Рисунок 1.

Содержание диеновых конъюгатов и параметры биохемилюминесценции в сердце крыс в ходе развития адреналинового миокардита.

А - содержание диеновых конъюгатов (ДК, мкмоль/л); Б - интенсивность максимальной вспышки (I_{\max} , mV); В - светосумма медленной вспышки (S), mV·с; Г - тангенс угла падения кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_2$).

Исследование изменения активности ГП в ходе развития адреналинового миокардита показало, что максимальная активность наблюдается через 24 ч после введения адреналина. При этом активность в расчете на грамм сырой массы и удельная активность увеличивались соответственно в 1,5 и 1,4 раза.

Максимальный уровень ГР в сердце крыс при адреналиновом миокардите был зарегистрирован через 24 ч после индукции патологии. Активность на грамм сырой массы и удельная активность увеличивались в 1,9 и 1,8 раза соответственно. На 30-м и 36-м ч развития адреналинового миокардита удельная активность ГР была повышена в 1,5 и 1,4 раза соответственно. По-видимому, наблюдаемые изменения активностей ГП и ГР (рис. 2), являющиеся защитной реакцией организма на интенсификацию СО при развитии адреналинового миокардита, могут быть как результатом их активации, так и стимуляции синтеза.

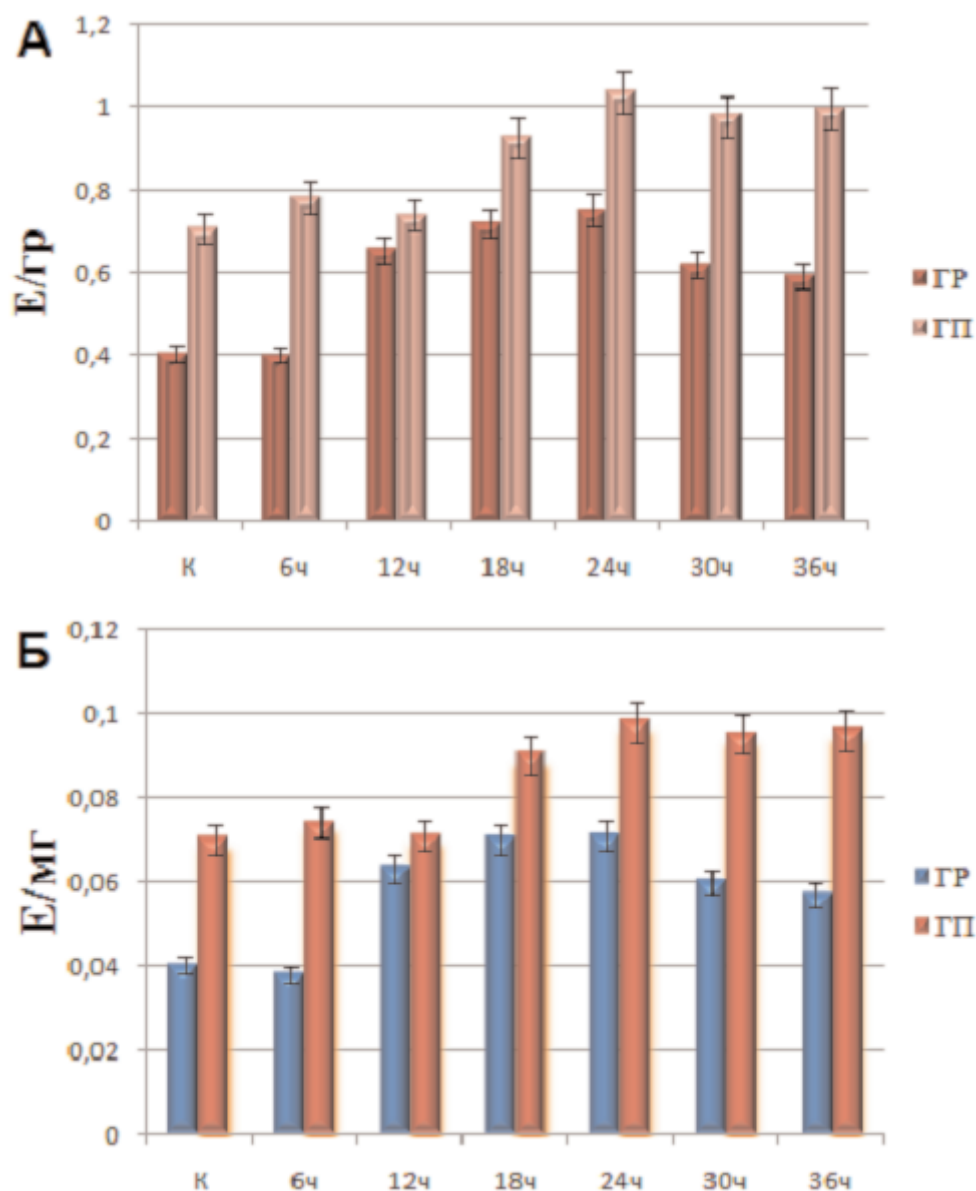


Рисунок 2.

Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, выраженная в виде Ед на грамм сырой массы (А) и удельной активности (Б) в сердце крыс в норме (К) и динамике развития адреналинового миокардита.

Коэффициенты корреляции, отражающие зависимость между активностью ГР и содержанием диеновых конъюгатов, I_{\max} , S имели значения 0,89, 0,81, 0,54. Значения коэффициентов корреляции между концентрацией диеновых конъюгатов, I_{\max} , S и активностью ГП: 0,64, 0,85, 0,75 соответственно. Такая зависимость показывает, что интенсивность СО взаимосвязана с активностью ГР/ГП системы. Однако механизм, благодаря которому происходит активация ГП и ГР при интенсификации СО, остаётся не вполне ясным. В связи с этим, было проведено исследование экспрессии ГР/ГП системы при адреналиновом миокардите у крыс. Для этого из сердца крыс на 24 ч развития адреналинового

миокардита была экстрагирована тотальная РНК. Электрофореграмма выделенной РНК свидетельствует, что количество 28S рРНК значительно преобладает над 18S рРНК (рис. 3). Это позволяет сделать вывод об отсутствии деградации полученной РНК под действием рибонуклеаз. После проведения реакции обратной транскрипции были оптимизированы временные и температурные характеристики полимеразной цепной реакции и подобрана концентрация праймеров для обеспечения высокой эффективности и специфичности реакции амплификации.

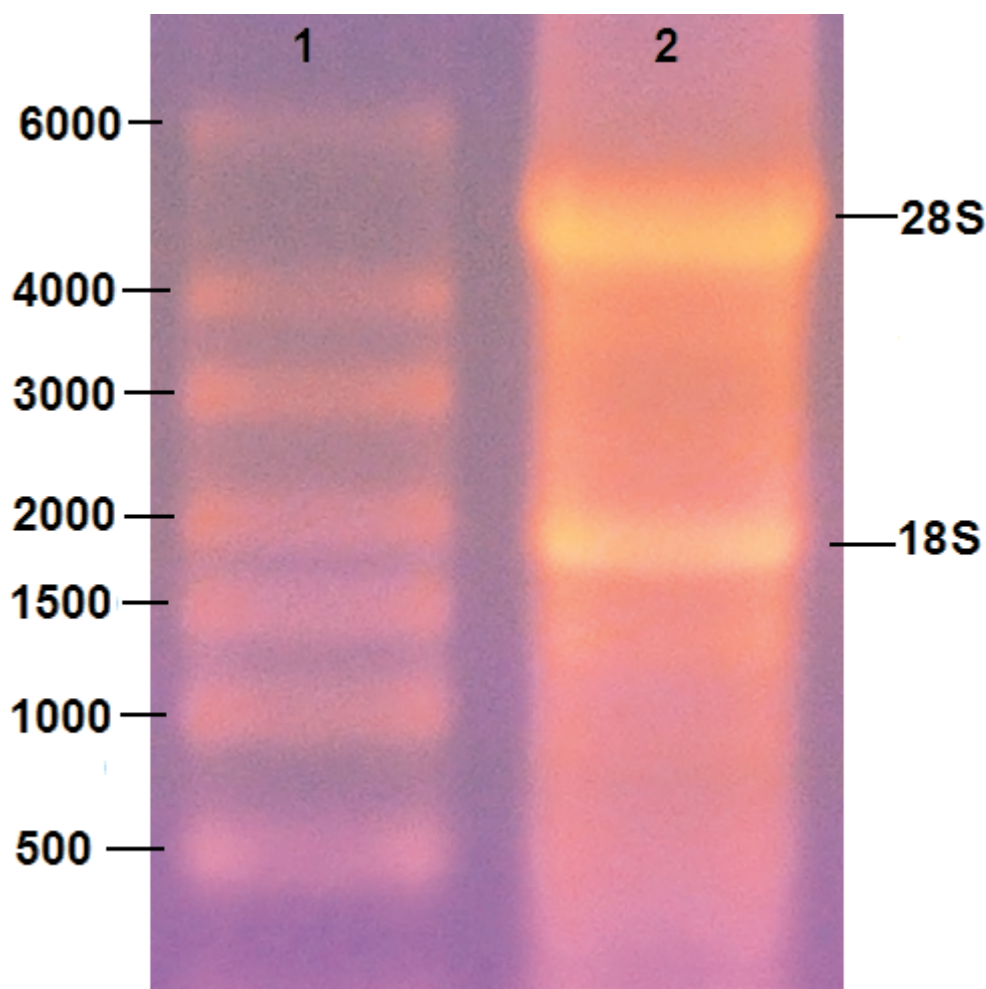


Рисунок 3.

Электрофорез РНК из сердца крысы в денатурирующем 1% агарозном геле.
1 - маркер молекулярного веса РНК RiboRuler™ High Range RNA Ladder; 2 - тотальная РНК.

Анализ экспрессии генов *Grx1* и *Gsr* с учётом эффективности амплификации позволил установить, что через 24 ч. после индукции патологии уровень этих транскриптов увеличивается. Экспрессия *Grx1* возросла в 7,3 раза, а *Gsr* в 2,8 раза относительно нормы (рис. 4). Возможно, это связано с действием регуляторов *SoxRS* и *OxyR*, которые при воздействии супероксида и пероксида водорода способны индуцировать экспрессию ряда антиоксидантных белков [2].

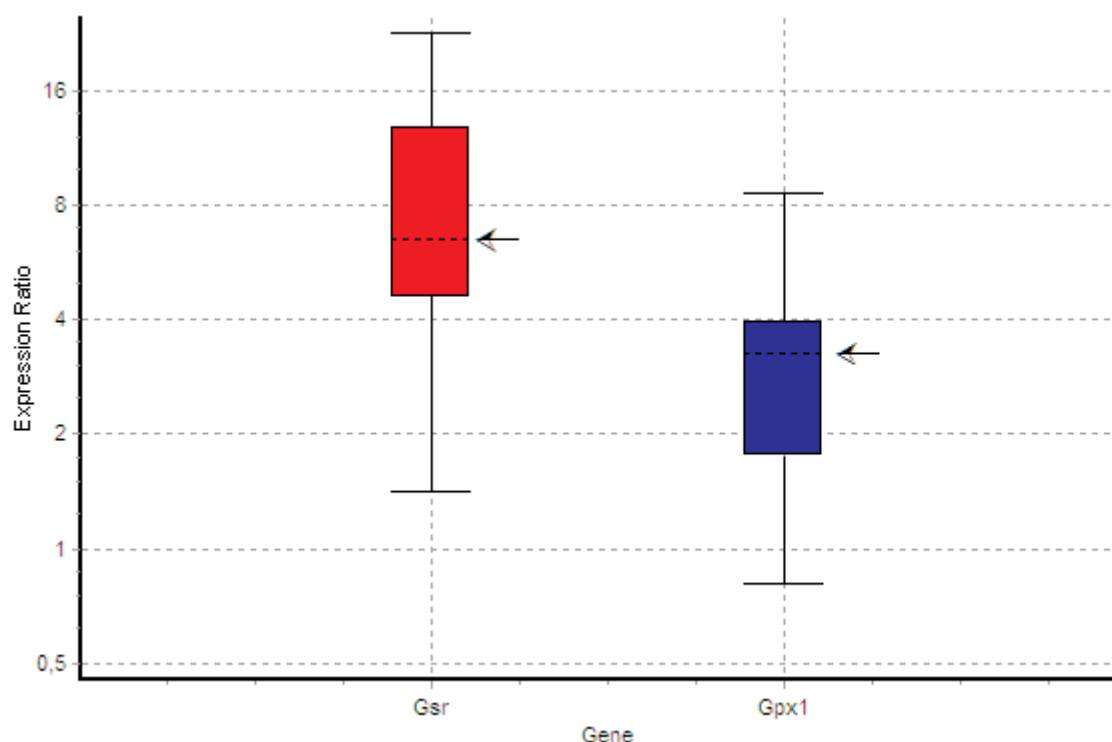


Рисунок 4.

Уровень транскриптов генов Gsr и Gpx1 в сердце крысы на 24 ч развития адреналинового миокардита, рассчитанный с помощью программного обеспечения Rest 2008 (стрелкой показана медиана статистического распределения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что одним из факторов, способствующим увеличению активности ГР/ГП системы, может являться индукция синтеза данных ферментов. Нельзя исключить, что гиперэкспрессия данных ферментов необходима для увеличения устойчивости клеток к окислительному стрессу, который служит одним из ключевых звеньев патогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Потапович А.И., Костюк В.А.* (2003) Биохимия, **68**, 632-638.
2. *Николайчик Е.А.* (2007) Регуляция метаболизма клетки: курс лекций, Изд-во БГУ, Минск.
3. *Шишкина Л.Н., Смотряева М.А.* (2000) Биохимия, **45**, 844-852.
4. *Кузьменко А.И.* (1997) Биохимия, **62**, 712-715.
5. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Изд-во Наука, Москва.
6. *Skulachev V.P.* (1997) Bioscience Reports, **17**, 347-366.
7. *Непомнящих Л.М., Лушников Е.Л., Семенов Д.Е.* (2002) Бюлл. exper. биол. мед., **134**, 219-226.
8. *Стальная И.Д., Гаришвили И.Д.* (1977) Современные методы в биохимии, Изд-во Медицина, Москва, с. 66-68.

9. *Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002) Nucleic Acids Research, 30, E36.*
10. *Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. (2001) Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel, Изд-во Морион, Киев.*

Поступила: 01. 06. 2010.

**INTENSITY OF CARDIAC FREE-RADICALS PROCESSES AND EXPRESSION
OF GLUTATHIONE PEROXIDASE AND GLUTATHIONE REDUCTASE GENES IN RATS
WITH ADRENALINE**

I.Y. Iskusnykh, T.N. Popova, O.S. Musharova

Voronezh State University, University sq., 1, Voronezh, 394006 Russia; fax: 7(4732)208-755;
e-mail: iskusnykh777@mail.ru

The correlation between changes in activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase in heart of rats during development of adrenaline myocarditis and intensity of free radical processes estimated by biochemiluminesce parameters and the content of lipoperoxidation products was demonstrated. The maximal increase of glutathione peroxidase and glutathione reductase activities (in 1.8 and 1.4 times accordingly) was observed t 24 h after the development of the pathological process; this coincided with the maximum intensity of prosesses of free radical oxidation. Using combination of reverse transcriptions with real-time polymerase chain reaction the cardiac mRNA levels of glutathione peroxidase and glutathione reductase genes were determined during the development of adrenaline myocarditis in rats. Analysis of expression of glutathione peroxidase and glutathione reductase genes showed, that the level of this transcripts demonstrated 2,8- and 7,3- increase in rats with adrenaline myocarditis, respectively. Obviously, overexpression of these enzymes can increase the resistance of cardiomyocytes to oxidative stress.

Key words: overexpression, oxidative stress, myocarditis, glutathione peroxidase, glutathione reductase.