

На правах рукописи

УДК. 591.111.1+599.325.1

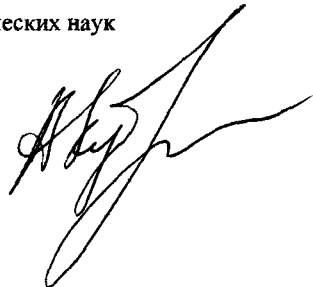
КУДРЯШОВ АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В ЕСТЕСТВЕННОМ
СТАРЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ, ПРОДУЦИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ
НОРМАЛЬНОГО И НАПРЯЖЕННОГО ЭРИТРОПОЭЗА

03.00.04. - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Тюмень – 2002

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии человека и животных биологического факультета Красноярского государственного университета

Научные руководители:

Савченко А.А. - доктор медицинских наук, профессор.

Титова Н.М. - кандидат биологических наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Ральченко И.В. - доктор биологических наук, профессор.

Нефедов В.П. - доктор биологических наук, профессор.

Ведущая организация:

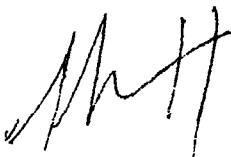
Институт Биофизики СО РАН, г. Красноярск.

Защита состоится " 7 " февраля 2002 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.274.07 в Тюменском государственном университете. (025043, Тюмень, ул. Пирогова, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета.

Автореферат разослан " 5 " января 2002 года.

Ученый секретарь диссертационного
Совета, доктор биологических
наук, профессор



Е.В. Чиряев

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Одной из основных проблем современной биологии и медицины является выяснение молекулярных процессов, определяющих продолжительность жизни организмов. Эритроциты млекопитающих, лишенные ядра, клеточных органелл и аппарата обновления белковых молекул, являются простым и удобным объектом для исследования процессов старения на молекулярном и клеточном уровнях. Более того, особые преимущества этих клеток связаны также с их легкой доступностью и возможностью разделения на различные возрастные группы.

Физиологическая функция эритроцита неразрывно связана с образованием АФК, играющих важную роль в механизмах повреждения биомолекул (ПОЛ, ОМБ) (Chen et al., 1999). Развитие СРО в настоящее время рассматривается как один из ключевых факторов, патогенеза ряда заболеваний, а также как фактор старения клетки и всего организма в целом (Дурнов и др., 1998; Berlett et al., 1997; Beckman et al., 1998). Еще в 1954 г. D. Harman сформулировал основное положение свободнорадикальной теории старения, гласившее, что универсальной причиной старения служит свободнорадикальное окисление липидов, жиров и белков всех организмов кислородом воздуха (Harman, 1994). Для эритроцитов, чей род деятельности связан с транспортом высоких концентраций O_2 , данная теория является наиболее актуальной.

Указанная выше возможность окисления биомолекул в эритроцитах ограничивается низкомолекулярным и ферментативным звеньями АОС. Важная роль в данной системе принадлежит компонентам участвующим в метаболизме GSH (Г6ФДГ, ГР, ГПО, GST, аскорбат, токоферол), совместное действие которых обеспечивает защиту белковых и липидных структур от негативного действия АФК (Liu et al., 1997; Hippeli et al., 1999; Maarten et al., 1999; Bronzetti et al., 2001; Nameth et al., 2001).

При сравнении молодых эритроцитов с клетками старшего возраста многими исследователями отмечается ряд изменений морфологического, функционального, физико-химического и биохимического характера (Боровкова, 1983; Masala et al., 1983; Grimes, 1986; Pieri et al., 1990; Piomelli, 1990; Parsons et al., 1996; Minetti et al., 2001), среди которых минимальное внимание уделено глутатион-связанным компонентам АОС при старении ЭЦ (Jain et al., 1980; Stohs et al., 1986; Onaran et al., 1998).

Комплексность и взаимосвязанность обменных процессов, даже в столь метаболически упрощенном эритроците, затрудняет выявление начального звена при

старении клетки. В связи с этим целесообразно для выяснения механизмов старения использовать различные модели, ускоряющие или замедляющие этот процесс (Асиньяров, 1990; Матвеев и др., 1999). В рамках настоящей работы был использован напряженный эритропоэз, как модель ускоренного старения эритроцитов.

Напряженный эритропоэз достигался острой (массивной) кровопотерей, не превышающей 43% общего объема крови, исходя из того, что объем крови у теплокровных животных составляет 7% от массы тела (Nerenberg et al., 1975). Известно, что в условиях гипоксии, развивающейся при острой кровопотере, наблюдается гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) (Бурлакова и др., 1992; Кудряшов и др., 2000; Wilhelm et al., 1999; Lee et al., 2001). Следовательно, острая кровопотеря является одним из стрессовых факторов для организма животных и человека, вызывающим мобилизацию различных систем, в том числе и АОС (Волкова и др., 1997; Белан, 2000; Мальшев и др., 2000). В эритроцитах, образованных в условиях напряженного эритропоэза, в виду ускоренной их продукции в костном мозге, а также усиленной эксплуатации после выхода в кровяное русло, быстрее, чем в эритроцитах образованных в условиях нормального эритропоэза наблюдается падение активности ферментов, приводящее к преждевременному старению клетки и ее элиминации из общего кровотока. Роль глутатионовой системы при старении эритроцитов, продуцированных в условиях напряженного (экстремального) эритропоэза, не изучена.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью работы явилось выяснение роли глутатионового звена антиоксидантной системы в старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Сравнительное изучение внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона, динамики активности ферментов его метаболизма - глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (GST), глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), содержания различных типов SH-групп; концентрации аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм при старении эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.
2. Сравнительное изучение процессов перекисного окисления липидов (содержание диеновых конъюгатов) и окислительной модификации белков (содержание фенолигидразонов) в эритроцитах разного возраста, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.
3. Оценка функционально-динамических связей между параметрами глутатионовой

антиоксидантной системы и окислительным метаболизмом в онтогенезе эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.

4. Выявление из комплекса изучаемых параметров наиболее информативных показателей, максимально отражающих процесс старения красных клеток крови в норме и при стресс-воздействии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Впервые было проведено комплексное изучение компонентов глутатионového звена антиоксидантной системы, содержания различных типов сульфгидрильных групп, аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм, процессов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов во фракции молодых, старых эритроцитов и общей эритроцитарной массе, образованных в условиях нормального эритропоэза. Новым явилось изучение всех перечисленных параметров при старении эритроцитов на 7, 20, 30 сутки после массивной однократной кровопотери. Показано влияние восстановленного глутатиона на продолжительность жизни эритроцитов, а также его участие в поддержании нативной структуры эритроцитарных белков в онтогенезе красных клеток крови. Впервые показаны данные корреляционных взаимосвязей между глутатионовыми компонентами антиоксидантной системы и окислительными процессами во фракции молодых, старых ЭЦ, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза. Впервые при выявлении закономерностей изменения активности глутатионовой системы и уровня окислительного метаболизма при старении ЭЦ использован метод нейросетевого моделирования, позволивший выделить наиболее информативные для процесса старения красных кровяных клеток показатели из комплекса исследованных параметров. Для характеристики процесса старения эритроцитов, впервые применен индекс прооксидантного статуса клетки (A/P), отражающий интенсивность свободнорадикальных процессов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ. Полученные результаты представляют интерес в выяснение общих возраст-зависимых механизмов и гипоксических (после кровопотери) состояний, для которых показана ведущая роль свободнорадикальных процессов, приводящих к изменению структурно-функциональных свойств эритроцитов. Результаты работы вносят вклад в понимание механизмов снижения активности восстанавливающих и использующих GSH ферментов, роли аскорбиновой кислоты и тиоловых групп при старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза. Кроме того, исследования, проведенные в данной работе, свидетельствуют о том, что эритроциты, образованные после стресс-воздействия (массивная кровопотеря), являются качественно иными по сравнению с клетками, продуцированными в условиях

нормального эритропоэза.

Выявленные факторы, обуславливающие снижение жизнеспособности при старении эритроцитов, открывают возможности коррекции нарушений, возникающих в системе красной крови при состояниях, способствующих усилению СРО.

Материалы диссертации используются при чтении спецкурсов студентам биологического факультета Красноярского Госуниверситета. Методики, изложенные в диссертации, включены в разделы большого и малого практикума по биохимии на кафедре биохимии и физиологии человека и животных КрасГУ, а также используются студентами в процессе выполнения курсовых и дипломных работ.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. При старении эритроцитов, образованных в условиях нормального эритропоэза, имеет место снижение эффективности функционирования глутатионовых ферментов (ГПО, GST, GP, Г6ФДГ), содержания белковых и небелковых тиоловых групп, концентрации окисленной и восстановленной аскорбиновой кислоты на фоне повышения дикетоглулоновой кислоты, процессов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов.
2. Эритроциты, продуцированные при напряженном эритропоэзе являются качественно иными по активности ГПО, GST, GP, Г6ФДГ, содержанию различных типов сульфгидрильных групп, аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм, а также уровню окислительного метаболизма по сравнению с клетками, образованными в условиях нормального эритропоэза. Степень напряжения эритропоэза определяет структурное и функциональное состояние GSH-зависимых компонентов АОС в эритроцитах, образованных после кровопотери.
3. Фракция молодых, старых эритроцитов и общая эритроцитарная масса, полученные после кровопотери характеризуются более выраженными изменениями исследованных параметров на 7 сутки по сравнению с контрольными значениями; менее на 20, а к 30 возвращаются к фоновым величинам. Это свидетельствует об эффективном восстановлении системы эритронов у экспериментальных животных к 30 суткам после массивной кровопотери.
4. Нарушения внутриклеточного редокс статуса со стороны антиоксидантной системы, включающей восстановленный глутатион, являются решающими в ограничении сроков жизни и ускоренной элиминации из кровяного русла эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза, вызванного кровопотерей.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ: Основные положения работы доложены и обсуждены на XXXVII междунар. научн. студенч. конф. "Студент и научно -

технический прогресс”, Новосибирск, 14 апреля 1999; II съезд биофизиков России, Москва, 23-27 августа 1999; Всеросс. науч.-практич. молодежный симпозиум “Экология байкала и прибайкалья”, Иркутск, 19-22 октября 1999; X Междунар. симпозиум “Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты”, Красноярск, 9 февраля 2000; Научн. молодежная конф. СО РАМН “Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины”, Новосибирск, 16 марта 2000; Междунар. конгресс “Научная молодежь на пороге XXI века”, Томск, 18-19 мая 2000; Росс. Конф.: “Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях”, Москва, 26-29 сентября 2000; Междунар. научн. конф. студ. аспирант. и молод. ученых “Молодая наука - XXI веку”, Иваново, 19-20 апреля 2001; XVIII Съезд Физиол. общ-ва им. И.П. Павлова, Казань, 26 сентября 2001; Всеросс. научн. конф. с междунар. участием “Север-Человек: проблемы сохранения здоровья”, Красноярск, 2-4 октября 2001; Красноярское отделение. Всеросс. Физиол. общества им. И.П. Павлова, Красноярск, 31 октября 2001.

ПУБЛИКАЦИИ: Основные положения диссертации опубликованы в 13 печатных работах.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация изложена на страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения и обсуждения результатов исследования, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (297 источников, в том числе 221 иностранных). Диссертация содержит 13 таблиц и проиллюстрирована 9 рисунками, 6 схемами.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Объектом исследования служили полуторагодовалые кролики самцы породы Шиншилла весом 2,5-3,0 кг. Всего в работе использовано 105 животных. Глубину кровопотери (43% от общего объема крови) определяли исходя из того, что объем крови у теплокровных животных составляет 7% от массы тела (Nerenberg et al., 1975). Через определенные временные интервалы осуществляли повторное взятие крови у анемизированных животных на 7 сутки после кровопотери (1 группа животных), в это время отмечается повышенный ретикулоцитоз; на 20 (2 группа животных) - когда эритроциты, образованные до кровопотери покидают кровяное русло; и на 30 (3 группа животных) - в период восстановления основных гематологических показателей. Забор крови проводили из уха путем надрезания краевой ушной вены; антикоагулянтном служил гепарин. Определение активностей ГПО (Paglia et al., 1967), GST (Habig et al., 1974), ГР

(Савченко, 1996), Г6ФДГ (Beutler, 1975), содержания различных типов (BCSH, 3SH, суммы всех тиоловых групп) SH-групп (Веревкина и др., 1977), GSH (Beutler, 1990), аскорбиновой кислоты, ее окисленных форм (дегидроаскорбиновой, дикетогулоновой кислот) и суммы всех форм аскорбиновых кислот (метод Roe (1943) в модификации Соколовского и др., 1967), а также процессов ПОЛ (по накоплению диеновых конъюгатов) (Каган и др., 1986) и окислительной модификации белков (по образованию фенилгидразонов) (Oliver et al., 1987) проводили во фракционированных (ФМЭ, ФСЭ) и нефракционированных (ОЭМ) эритроцитов полученных от интактных животных и анемизированных животных на 7, 20, 30 сутки после кровопотери. Разделение эритроцитов на молодые и старые проводили путем их многократного центрифугирования взвешенных в плазме и последовательного отбора верхней (ФМЭ) и нижней (ФСЭ) частей эритроцитарного осадка (Аврамова и др., 1978). Результаты экспериментов подвергали статистической обработке. Все серии опытов сравнивали по непараметрическим ранговым критериям Уилкоксона (Т-критерий) и Манна-Уитни (U-тест). Для оценки наличия связи и характера этой связи между исследованными параметрами использовали корреляционный анализ по Пирсону. В обоих случаях пользовались пакетом "Statistica 6.0". Определение информативности изучаемых параметров оценивали с помощью нейросетевого моделирования в программном пакете "StatInfo 4.0". Различия во всех случаях считали значимыми при $P < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ:

Проведенные нами исследования обнаружили наибольшую активность ГПО, GST, GP, Г6ФДГ, концентрацию GSH, BCSH, 3SH, Σ SH, АК, ДАК, Σ АК, а также наименьшее содержание ДКГК, ДК, ОМБ во ФМЭ, содержащей 10-12% ретикулоцитов. Интенсивность данных параметров была снижена соответственно на 56%, 49%, 49%, 27%, 53%, 32%, 50%, 37%, 46%, 37%, 32% и повышена соответственно на 97%, 45%, 73% во ФСЭ по сравнению с уровнем исследованных параметров во ФМЭ, принятых за 100% (Рис. 1).

Обнаруженное возраст-зависимое снижение содержания восстановленного глутатиона можно объяснить следующим образом.

Во-первых, истощение GSH при старении ЭЦ связано с активным использованием данного тиола ГПО и GST. Об этом свидетельствуют результаты, полученные с помощью нейросетевого моделирования, указывающие на высокую информативность данных энзимов среди остальных исследованных параметров при старении ЭЦ. Основная часть ГПО локализована на цитоплазматической стороне мембраны (Sunde, 1994), поэтому, нейтрализуя перекиси данный энзим обеспечивает

защиту компонентов ПМ от окисления АФК, и следовательно, от повреждения белковых молекул продуктами ПОЛ.

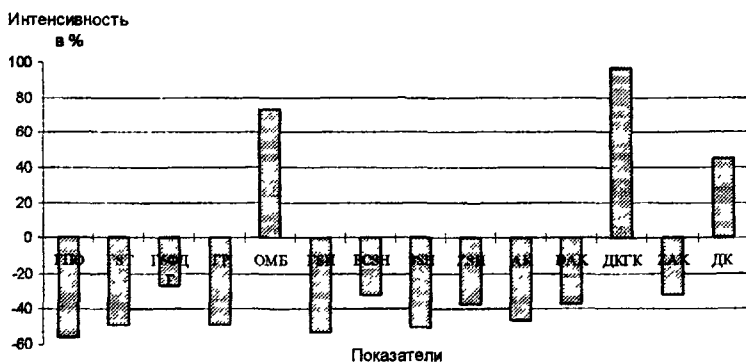


Рис.1.Изменение интенсивности исследованных параметров (повышение/снижение) при старении эритроцитов, образованных в условиях нормального эритропоэза: 0 - уровень исследованных параметров во ФМЭ, принятый за 100%.

Обнаруженные корреляции между ГПО и содержанием ДАК, ДКГК, ДК во ФСЭ указывают на зависимость активности данного фермента от целостности ПМ, и в частности от содержания витамина Е, принимающего непосредственное участие в обмене селена (Navarro et al., 1998). В работе Vozkaya (2001) показано, что недостаток токоферола вызывает снижение уровня ГПО на 30%, и GSH на 20%. Ранее проведенные исследования в нашей лаборатории обнаружили падение содержания токоферола в ПМ на 29% при старении ЭЦ (Боровкова, 1983).

Заметное возрастание значимости GST, равно как и ГПО, во ФСЭ по сравнению с ФМЭ может происходить по нескольким причинам. Глутатион-S-трансфераза, как известно, помимо конъюгации электрофильных соединений (Armstrong, 1997), обладает неселеновой активностью по отношению к органическим гидроперекисям (Hunaiti et al., 2000), а также тиолтрансферазной активностью (Tew et al., 1993; Noda et al., 2000). Исходя из этого, можно предположить повышение “комплексной” значимости GST, выраженной в нейтрализации липоперекисей, электрофильных соединений и восстановлении дисульфидных групп в белках. В то же время активность GST, исходя из литературных данных, чувствительна к своим продуктам реакции, в составе которых есть длинная углеродводородная цепочка (C₆-C₁₀) (Noda et al., 2000). Накопление в клетке конъюгированных с GSH продуктов при старении ЭЦ, связано с возникающим дефицитом АТФ (Parsons et al., 1996), который необходим для работы АТФ-зависимого MRP-насоса, удаляющего конъюгаты-SG из клеток (Cole

et al., 1998; Kepler, 1999).

Во-вторых, при старении красных кровяных клеток, нами отмечен спад активности ГР и Г6ФДГ, принимающих непосредственное участие в редукции окисленного глутатиона в восстановленную форму. Обнаружено, что с возрастанием уровня ОМБ при старении ЭЦ происходит снижение ГР, при этом во ФМЭ для ГР выявлена положительная между ЗSH и отрицательная между ОМБ связи. Сопоставляя литературные (Jochheim et al., 1994), а также наши данные, мы предположили, что активность ГР при старении эритроцитов зависит от уровня окислительной модификации редокс-активных тиоловых групп в активном центре данного фермента.

Одновременно с увеличением окислительной модификации белков при старении ЭЦ происходит падение активности Г6ФДГ, что может быть обусловлено посттрансляционными модификациями, приводящими к определенным конформационным перестройкам белка с последующим изменением его каталитических, и регуляторных характеристик. Так, в ряде работ отмечается возможность частичной диссоциации димерной формы до мономерной (Grimes, 1986), увеличение K_m и уменьшение V_{max} для глюкозо-6-фосфата (Piomelli, 1990), снижение кооперативных свойств с одновременным спадом активности данного фермента при старении ЭЦ (Oliver et al., 1987). Наличие подобной связи также свидетельствует о том, что с возрастанием скорости окислительных процессов происходит усиленный метаболизм GSH, который повышает потребность клетки в активации механизма восстановления ГSSG за счет участия связанных между собой ГР и Г6ФДГ во ФМЭ. Но, дальнейший рост интенсивности окисления, усиливающегося с возрастом клетки, потребует необходимое количество восстановленных эквивалентов (НАДФН, GSH), в ходе повышения потока глюкозы через ПФП, чем через гликолиз. Это в конечном итоге может привести к срыву функциональной активности ПФП. В подтверждение свидетельствуют экспериментальные данные, показывающие снижение максимальной скорости ПФП, пропорциональное падению стационарной концентрации АТФ, нижний порог которой пропорционален порогу начала окислительного гемолиза эритроцитов при окислительном стрессе (Атауллаханов и др., 1981; Salvemini et al., 1999). Следовательно, еще одним из факторов влияющих на спад активности Г6ФДГ и возможно ПФП в целом, может быть, уменьшение концентрации GSH ниже определенного клеткой уровня в условиях повышения уровня окислительного метаболизма при старении эритроцитов.

При старении ЭЦ с одновременным повышением ОМБ наблюдалось снижение ΣSH , которое происходило, в основном, за счет ЗSH. Падению ЗSH способен препятствовать процесс восстановления окисленных белковосвязанных тиоловых

групп, содержание которых, в свою очередь, зависит от скорости образования продуктов ПОЛ. Окисленные BCSH во ФМЭ восстанавливаются с участием GSH-зависимых ферментов и АК. Последняя нейтрализует АФК, участвует в восстановлении α -токоферола и тем самым препятствует образованию продуктов ПОЛ (Fukuzawa et al., 1997; Burkitt, 2001). Необходимый для этих процессов внутриклеточный уровень восстановленного глутатиона поддерживается в ЭЦ, в основном, за счет глутатионредуктазной активности, которая при старении данных клеток достоверно снижается.

Заслуживает внимания связь между аскорбатом и сульфгидрильными группами. Так во ФМЭ восстановление ДАК происходит с участием GSH. На это указывают положительные корреляции между GSH: Σ АК, АК: Σ АК, ДАК: Σ АК. Обнаруженные корреляционные связи свидетельствуют о том, что сумма всех форм аскорбиновых кислот во ФМЭ складывается из поступления ДАК в клетку, а также за счет восстановления ДАК, то есть из восстановленной аскорбиновой кислоты. При этом, известно, что в ЭЦ млекопитающих концентрация ДАК соответствует таковой в плазме (Mendiratta et al., 1998). Поэтому активная редукция ДАК повысит содержание АК и уменьшит концентрацию ДАК, что естественно при относительной структурно-функциональной целостности ПМ повлечет к восстановлению баланса между внутри- и внеклеточным уровнем ДАК за счет пассивного транспорта данного соединения в клетку (Rose, 1988). При старении ЭЦ из-за усиления ПОЛ (ДК повышаются на 45%) происходят структурные изменения ПМ приводящие к размыванию отрицательного заряда на цитоплазматической поверхности, за счет появления фосфатидилсерина и сильно основного участка (15 аминокислотных остатков) анкирина на внешней стороне мембраны (Батрукова и др., 2000; Jong et al., 2001). Подобные возраст-зависимые изменения ПМ приводят к затруднению входа ДАК в клетку и появлению возможности выхода АК из клетки. Также с помощью корреляционного анализа обнаружено, что большая часть GSH при старении ЭЦ активно используется в ферментативном восстановлении BCSH-групп. Ранее было показано, что истощение GSH в эритроцитах человека подверженных окислительному стрессу приводит к переключению процесса восстановления ДАК с GSH-зависимого (тиолтрансфераза) на НАДФН-зависимый (дегидроаскорбатредуктаза) путь (May et al., 1997), более медленный и через образование промежуточных реакционноспособных радикалов монодегидроаскорбиновой кислоты, которые, по-видимому, тоже вносят свой вклад в развитие окислительного метаболизма. Следовательно, старение ЭЦ сопровождается удлинением времени между появлением ДАК в результате окисления АК и восстановлением ДАК. Вероятно, этого временного промежутка достаточно при

усиление СРО для необратимого окисления ДАК с образованием ДКГК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что окислительная модификация аминокислотных остатков является для эритроцитарных белков процессом необратимым, поскольку в этих клетках отсутствует аппарат восстановления утраченных белковых молекул. В то время как, окисленные БСШ-группы, способны восстанавливаться в тиолтрансферазной реакции с участием ГШН. В пользу этого процесса указывают следующие обстоятельства. Первое, при старении ЭЦ более активно происходит снижение ЗШН-групп (на 50%), которое в обычных условиях недоступно (без денатурации), на фоне более слабого снижения БСШ (на 32%), расположенных на поверхности белковых молекул. Второе, восстановление БСШ-групп способствует снижению концентрации окисляющих агентов и таким образом, уменьшает вероятность окисления других не менее важных для белковой молекулы аминокислотных остатков.

Сравнение исследованных параметров при старении ЭЦ, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза, может способствовать пониманию определенных закономерностей механизмов с участием изученных параметров. Исследование разных по возрасту эритроцитов на 7, 20 и 30 сутки после кровопотери обнаружило повышенную активность ГПО, ГСТ, ГР, Г6ФДГ, концентрацию ЗШН, ДАК, ДКГК, Σ АК, на фоне наименьшего содержания ГШН, БСШ, Σ ШН, АК, продуктов ПОЛ, ОМБ по сравнению с соответствующими фракциями интактных эритроцитов (Рис.3).

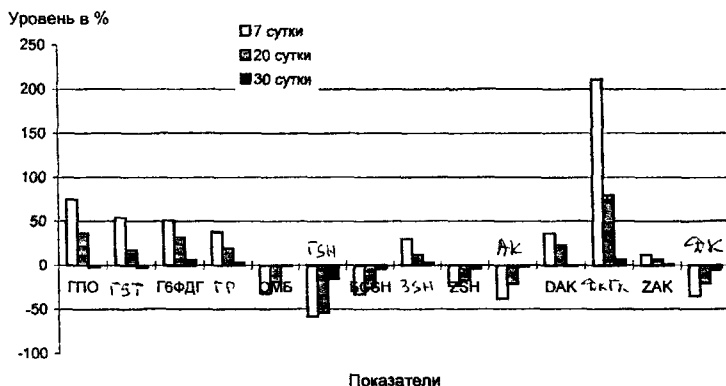


Рис.3.Изменение уровня исследованных параметров (повышение/снижение) при старении эритроцитов, полученных от анемизированных животных на 7, 20 и 30 сутки после кровопотери относительно изменения соответствующих параметров при старении эритроцитов интактных кроликов, принятых за 100% (0 по оси ординат).

Подобные изменения исследованных параметров были более выражены на 7 сутки, менее на 20 и к 30 суткам возвращались к фоновым величинам.

Причиной повышения активности ГПО, GST, GR, Г6ФДГ, может быть, изменение количества ферментов в клетке и/или изменение их кинетических свойств. Последнее подтверждают данные по изучению кинетических параметров фосфофруктокиназы (ФФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) при старении ЭЦ, образованных в условиях напряженного эритропоэза (Титова, 1984; Смолина и др., 1996). Величина K_m для субстратов и кофакторов данных энзимов во ФМЭ на 7 сутки имела меньшее значение, но большую активность, чем во ФМЭ интактных кроликов.

В пользу увеличения количества данных ферментов в ходе их синтеза с мРНК указывает обнаруженный контроль экспрессии антиоксидантных генов от продукции АФК (Cimino et al., 1997). Известно, гипоксия, вызванная кровопотерей повышает скорость одноэлектронного восстановления O_2 , что в конечном итоге может активировать экспрессию генов АОС в клетках эритроидного ряда, находящихся еще в кроветворных органах. С выходом в периферическую кровь в эритроидных клетках полностью прекращаются процессы задействующие ДНК, но сохраняется мРНК, с которой может осуществляться синтез белка (Bettinger et al., 2001; Ostareck, 2001). Еще одним плюсом в пользу увеличения активности АОС ферментов, за счет повышения количества белковых молекул, может быть повышенное содержание ZSH во ФМЭ на 7 сутки после кровопотери, по сравнению с ФМЭ, образованных в условиях нормального эритропоэза. ZSH могут только подвергаться окислению с частичной или полной потерей функциональной активности SH-зависимых ферментов, а восстанавливаться и увеличиваться их содержание может только в результате синтеза белковых молекул (McMillan, 2001).

С повышением активности исследованных ферментов во ФМЭ на 7 сутки наблюдается падение содержания продуктов ПОЛ и ОМБ, параллельно отмечается уменьшение BCSH, GSH и АК, что может указывать на интенсивно протекающие окислительные процессы в этих клетках. Исходя из того, что активность ГПО, локализованная на цитоплазматической стороне мембраны увеличена больше остальных исследованных АОС ферментов, концентрация ДАК и ДКГК в клетке повышена, а дисенных конъюгатов снижена, можно заключить, что активно протекающий окислительный метаболизм во ФМЭ на 7 сутки после кровопотери в меньшей мере затрагивает ПМ, чем содержимое цитозоля данных клеток. Такая картина обуславливается тем, что продолжительный гипоксический шок опосредованно стимулирует ускоренную продукцию эритроидных клеток в кроветворных органах за счет укорочения генерационного времени,

продолжительности митотического цикла и времени созревания (Магакян и др., 1997; Белан, 2000). Таким образом, происходит выход “недозревших” клеток в общий кровоток, в которых активно протекают механизмы цито-дифференцировки (Yokota, 2001; Takada et al., 2001). Ускоренная специализация эритроидных клеток в закисленной среде периферической крови усиливает в этих клетках окислительные процессы, в результате чего выявляются характерные изменения исследуемых параметров.

Важно отметить резкое снижение GSH при старении ЭЦ на 7 сутки после кровопотери, которое происходит в результате повышенного метаболизма данного тиола ГПО и GST, ферментативного восстановления белковых дисульфидных групп. Согласно литературным данным, снижение уровня GSH в этих клетках может происходить, за счет ингибирования синтеза глутатиона эритропоэтином (Fillet et al., 2001), а также в среде, в которой повышен уровень свободнорадикального окисления, GSH расходуется в неферментативном восстановлении активных форм кислорода (Zhao et al., 2001).

Отмечено повышение Σ АК во ФМЭ на 7 сутки, происходящее при мобилизации симпатико-адреналовой системой тканевого депо, что в последствие, приводит к увеличению содержания ДАК в плазме и следовательно в клетке. Подобное повышение в условиях сниженных концентраций ДК, может свидетельствовать о низком уровне ПОЛ на клеточной мембране, и следовательно, об относительной ее целостности. Накопление ДКГК особенно во ФСЭ на 7 сутки после кровопотери, по сравнению с соответствующими фоновыми значениями, объясняется увеличением использования АК в различных окислительно-восстановительных процессах, а также в ходе медленной скорости восстановления ДАК. Проведенный корреляционный анализ выявил тесную взаимосвязь между динамикой содержания АК с активностью GST и Г6ФДГ при старении ЭЦ. Исходя из этого обнаруженный спад концентрации АК в процессе старения ЭЦ на 7 сутки сопровождается повышением активности GST во ФМЭ и дальнейшим падением во ФСЭ. Этот факт, а также наличие связи АК с Г6ФДГ свидетельствует о проявлении со стороны низких концентраций аскорбиновой кислоты прооксидантного эффекта при старении ЭЦ более выраженного при стресс-воздействии на систему красной крови.

Менее выраженный характер экспериментальных и статистических изменений среди исследованных параметров при старении эритроцитов на 20 и 30 сутки (Рис.2.) по сравнению с величинами соответствующих фракций на 7 сутки, может связан с лизисом старых ЭЦ, образованных еще до кровопотери, и функционально неприспособленных к транспорту O_2 эритроидных клеток, выброшенных в ответ на

кровопотерю. Исходя из этого, популяция эритроцитов присутствующая в общем, кровотоке на 20, и в большей мере, на 30 сутки характеризуется общей омоложенностью за счет присутствия клеток, образованных после массивной однократной кровопотери. Другими словами ФСЭ на 30 сутки после кровопотери представлена клетками, возраст которых составляет около 30 дней, что соответствует среднему возрасту входящих в ОЭМ клеток интактных животных. Но, несмотря на это, проведенное сравнение исследованных показателей между ФСЭ на 30 сутки после кровопускания и соответствующими показателями в ОЭМ интактных кроликов показало, что клетки во ФСЭ на 30 сутки по метаболическим характеристикам являются гораздо старше своего хронологического возраста (Рис.3.).

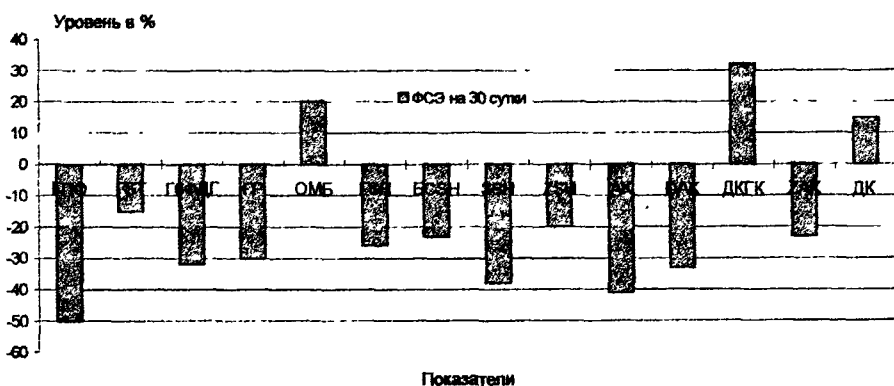


Рис.3. Изменение уровня (повышение/снижение) исследованных параметров во ФСЭ на 30 сутки относительно исследованных показателей в ОЭМ, принятых за 100% (0 - по оси ординат) интактных животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что эритроцитам, образованным в условиях напряженного эритропоэза первоначально характерны признаки молодых клеток - повышенная активность ферментов метаболизма глутатиона, концентрация ЗSH, сниженный уровень ДК и ОМБ. Вместе с тем, для них характерны признаки старых клеток: низкое содержание ГSH, БСН, АК и повышенная концентрация ДКГК. Как следует из экспериментальных данных, ранее полученных на нашей кафедре (Гительзон и др., 1960; Позтова и др., 1967), а также исходя из наших результатов, молодые клетки, образованные в условиях напряженного эритропоэза, являются качественно иными по сравнению с соответствующими клетками, продуцированными при нормальном кроветворении. При старении ЭЦ напряженного эритропоэза происходит более быстрое, чем в норме

снижение мощности глутатионовых компонентов АОС, что сопровождается существенным усилением свободнорадикального окисления, выражающегося в повышении ДК, ОМБ, ДКГК.

Следовательно, нарушение внутриклеточного состояния со стороны АОС, включающей глутатион, является ключевым фактором в старении эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.

Учитывая вышесказанное, мы определили, какие из исследованных параметров являются наиболее информативными при старении ЭЦ, образованных как в условиях нормального, так и напряженного эритропоэза. Для достижения этой цели значения исследованных показателей были подвергнуты системному анализу в нейросетевом классификаторе. На основе исходных данных нейронная сеть успешно обучилась. Информативными параметрами, из комплекса исследованных показателей, при старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза явились ГПО, БСН. Исходя из этого нами предложен индекс прооксидантного статуса (А/Р) клетки, рассчитанный как отношение экспериментально найденной концентрации БСН к активности ГПО в эритроцитах разного возраста, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза (Рис. 4).

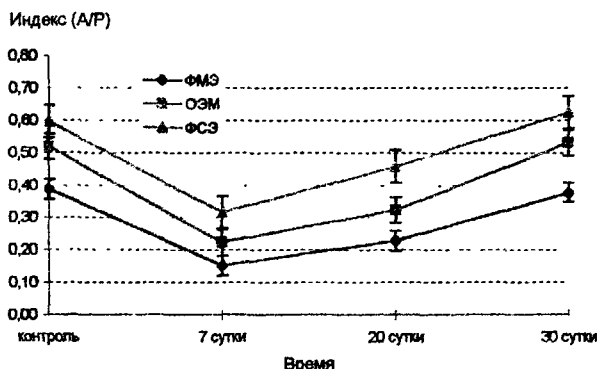


Рис. 4. Изменение прооксидантного статуса (индекс А/Р) при старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза

Примененный индекс А/Р наглядно отражает количественные изменения окислительного метаболизма при старении эритроцитов, чем эти или другие параметры взятые по отдельности. Найдено повышение А/Р во ОЭМ в 1,5 раза от

такового во ФМЭ, а во ФСЭ он составляет 0,59 от среднего значения равного 0,38 во ФМЭ, образованных в условиях нормального эритропоэза. Рассчитанный коэффициент, исходя из величин информативных показателей в условиях напряжения, демонстрирует спад окислительных процессов, который достигается за счет разрушения старых ЭЦ, образованных еще в условиях нормального эритропоэза, а также за счет усиления мощности компонентов глутатионовой системы, обеспечивающей антиоксидантную защиту клетки. Конечным итогом является общее омоложение популяции, более выраженное, на 7, затем на 20 и уже менее на 30 сутки после кровопотери.

Таким образом, полученные результаты представляют интерес в выяснение общих возраст-зависимых механизмов и гипоксических (после кровопотери) состояний, а также вносят вклад в понимание механизмов снижения активности восстанавливающих и использующих глутатион ферментов, роли аскорбиновой кислоты и тиоловых групп при старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.

ВЫВОДЫ

1. Старение эритроцитов, образованных в условиях нормального эритропоэза, сопровождается снижением активности ГПО, GST, ГР, Г6ФДГ, содержания GSH, белковосвязанных, замаскированных, суммы всех тиоловых групп, АК, ДАК, суммы всех форм аскорбиновых кислот и одновременным повышением концентрации ДКГК, ДК и ОМБ.
2. Редокс-система аскорбат/дегидроаскорбат тесно связана с системой глутатиона. Основной вклад в снижение содержания суммы всех форм АК при старении эритроцитов вносит восстановленная АК ввиду снижения скорости редукции ДАК, в результате падения концентрации восстановленного глутатиона. При физиологическом содержании GSH во ФМЭ аскорбат проявляет антиоксидантные свойства, а при истощении GSH во ФСЭ - прооксидантные.
3. При старении эритроцитов снижение содержания ZSH более выражено, чем BCSH-групп, что свидетельствует об эффективном участии GSH в сохранении в нативном состоянии тиол-чувствительных белков. Вероятно, данный механизм поддержания функционального и количественного состояния белковых молекул обеспечивает эритроцитам продолжительное существование в общем кровотоке, без аппарата обновления белков.
4. Исследование разных по возрасту эритроцитов на 7, 20 и 30 сутки после кровопотери обнаружило, что эти клетки, образованные в условиях напряженного эритропоэза, обладают повышенной активностью ГПО, GST, ГР, Г6ФДГ, концентрацией ZSH, ДАК, ДКГК, ΣАК, на фоне наименьшего содержания GSH, BCSH, ΣSH, АК, продуктов ПОЛ, ОМБ по сравнению с соответствующими фракциями интактных эритроцитов. Подобные изменения исследованных параметров были более выражены на 7 сутки, менее на 20 и к 30 суткам возвращались к фоновым величинам.
5. При старении эритроцитов напряженного эритропоэза происходит более быстрое, чем при старении эритроцитов нормального кроветворения снижение мощности глутатон-связанных компонентов антиоксидантной системы на фоне существенного усиления свободнорадикального окисления, выраженного в повышении ДК, ОМБ, ДКГК.
6. Ключевым фактором в старении эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза является падение концентрации восстановленного глутатиона на фоне усиления окислительного метаболизма.
7. Введенный нами индекс A/P более наглядно и количественно отражает повышение уровня окислительных процессов при старении эритроцитов и показывает динамическую зависимость подобных изменений от стресс-воздействия.

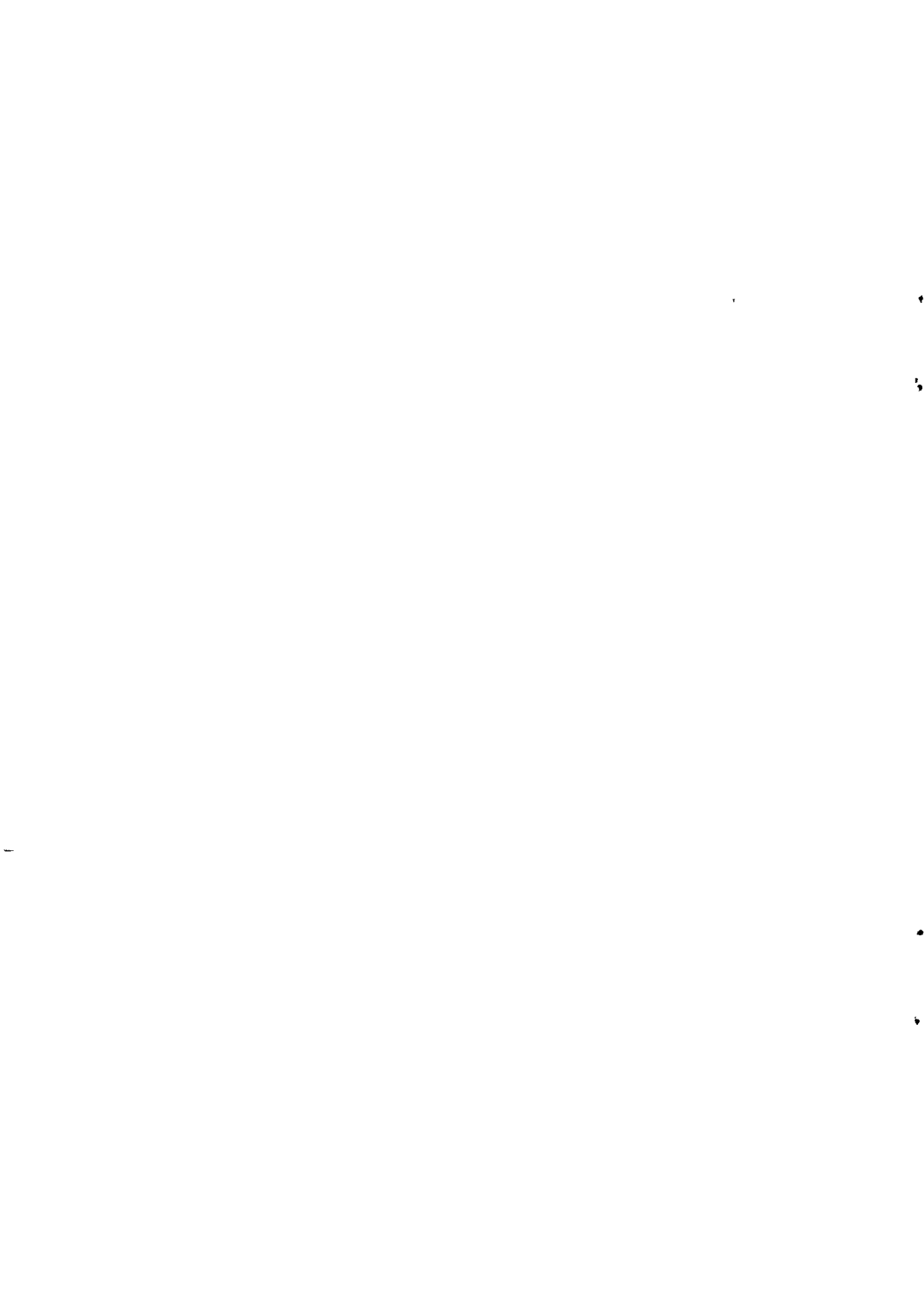
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изменение активности глутатионпероксидазы//Матер. молод. научн. конф. СО РАМН. "Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины.- Новосибирск.: Из-во НГУ.-2000.- С. 101-102. (В соавторстве с Корнюш Г.Г.)
2. Содержание восстановленного глутатиона и активности ферментов метаболизма глутатиона в эритроцитах после массивной кровопотери//Матер. XXXVII междунар. науч. студенч. конф. "Студент и научно-технический прогресс".- Новосибирск.-1999.-Ч.1.-С. 67-68.
3. Глутатион-S-трансферазная активность эритроцитов, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза//Сб. статей молод. ученых и спец-ов "НАУКИ О ЧЕЛОВЕКЕ"/Под ред. Огородова Л.М., Капилевич Л.В.-Томск.-2000.- С. 17-18.
4. Изменение активности ферментов метаболизма восстановленного глутатиона в эритроцитах образованных при экстремальном эритропоэзе//Матер. Росс. Конф. "Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях". – Москва.-2000.-Т.1.-С. 235-236. (соавторы Титова Н.М., Савченко А.А.)
5. Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы при окислительном стрессе//Там же.-2000.-Т.2.-С.120-121. (соавторы Титова Н.М., Корнюш Г.Г., Новикова Л.А.)
6. Изменение содержания SH-групп в онтогенезе эритроцитов//деп. в ВИНТИ.- 26.07.2000.-№ 2081-В00. (соавторстве с Титовой Н. М.)
7. Изучение состояния ферментативной антиоксидантной системы эритроцитов продуцированных в при стресс-эритропоэзе//Тез. докл. Всеросс. науч.-прак. молодежного симпоз. "ЭКОЛОГИЯ БАЙКАЛА И ПРИБАЙКАЛЬЯ".- Иркутск.- 1999.-С. 40.
8. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментативной антиоксидантной системы защиты в эритроцитах при окислительном стрессе//Тез. докл. II съезда биофизиков России.- Москва.-1999.- Т.2.-С.723-724. (соавторы: Титова Н.М., Новикова Л.А., Торопова Н.А.)
9. Биохимические и физиологические особенности функционирования высокоспециализированных клеток на примере эритроцитов//деп. в ВИНТИ.- 11.09.2001.-№1946-В2001.-26 с. (соавторстве с Титовой Н. М.)
- 10.Изменение активности ГПО при старении эритроцитов// Сб. науч. статей X Междунар. симпоз.: "Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты".- Москва.-2001.-С. 1-5.

- 11.Изменение скорости ферментативных реакций с участием восстановленного глутатиона в эритроцитах после массивной кровопотери//Матер. Всеросс. науч. конф. с междунар. участием. “Север-человек: пробл. сохран. здоровья” /Под ред. член-корр. РАМН, д.м.н., проф. Манчука В.Т.- Красноярск.-2001.-С. 168-170. (соавторстве с Титовой Н. М., Савченко А.А.)
- 12.Особенности изменения содержания аскорбата в эритроцитах разного возраста, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза//Тез. докл. XVIII Съезда Физиол. общ-ва им., И.П. Павлова.- Казань.-2001.- с. 367.
- 13.Распределение эритроцитов по стойкости при действии поллютантов с различными стресс характеристиками//Тез. докл. междунар. науч. конф. студ. аспирант. и молод. ученых “Молодая наука - XXI веку”.- Иваново.-2001.-С. 29-30.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АК** – восстановленная аскорбиновая кислота;
- АОС** – антиоксидантная система;
- АФК** – активные формы кислорода;
- BCSH** – белковосвязанные тиоловые группы (быстро- и вялореагирующие);
- Г6ФДГ** – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
- GSH** – восстановленный глутатион;
- GSSG** – окисленный глутатион;
- GST** – глутатион-S-трансфераза;
- ГПО** – глутатионпероксидаза;
- ГР** – глутатионредуктаза;
- ДАК** – дегидроаскорбиновая кислота (окисленная АК);
- ДК** – дисные конъюгаты (продукты ПОЛ);
- ДКГК** – дикетоглуоновая кислота (результат необратимого окисления ДАК);
- ЗSH** – замаскированные тиоловые группы (реагируют после денатурации белка);
- ОМБ** – окислительная модификация белков;
- ОЭМ** – общая эритроцитарная масса;
- ПМ** – плазматическая мембрана;
- ПФП** – пентозофосфатный путь;
- ПОЛ** – перекисное окисление липидов;
- СРО** – свободнорадикальное окисление;
- ФМЭ** – фракция молодых эритроцитов;
- ФСЭ** – фракция старых эритроцитов.
- ЭЦ** – эритроцит;
- ΣSH** – сумма всех тиоловых групп (GSH, BCSH, ЗSH);
- ΣАК** – сумма всех форм аскорбиновых кислот (АК, ДАК, ДКГК).



Отпечатано в ИПЦ КГТУ
660074, г. Красноярск, ул. Киренского, 26. Тел. 497-103
Тираж 100 экз. Заказ 132

2002-A
708
= -708