

УДК: 577.151.6:612.111/22

Возрастные особенности модуляции активности антиоксидантных ферментов при индуцированном окислительном стрессе
К.В.Гідулянова

Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины (Харьков, Украина)

Исследована активность антиоксидантных ферментов в гемолизате эритроцитов детей, подростков и взрослых в норме и при индуцированном окислительном стрессе. Для СОД и каталазы отмечен рост активности с возрастом. Изменение активности глутатионредуктазы имело противоположную направленность. В условиях окислительного стресса, вызванного средой Фентона, при 1-часовой инкубации отмечена компенсаторная реакция эритроцитов двух возрастных групп – детей и подростков. В эритроцитах взрослых 30–40 лет отмечено снижение активности всех исследованных ферментов в условиях данного эксперимента.

Ключевые слова: *окислительный стресс, антиоксидантные ферменты, онтогенез.*

Введение

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) в норме осуществляются непрерывно во всех тканях и клетках живых организмов и поддерживаются специальными регуляторными системами на низком базальном уровне, принимая участие в нормальных метаболических процессах и регуляторных функциях клетки. Хорошо известно разрушающее действие на мембраны клеток первичных и вторичных продуктов СРО липидов. Однако влияние СРО на клеточную резистентность может быть различной в зависимости от совокупности действия на мембраны ряда факторов, которые могут препятствовать или способствовать действию токсических продуктов СРО (Вьюшина, 2006; Зенков и др., 2001; Подколзин и др., 2000; Юрков и др., 1984; Valko et al., 2005; Abzhandadze et al., 2006; Rizvi et al., 2006). Для каждого этапа онтогенеза свойственен свой уровень интенсивности протекания процессов перекисного окисления липидов и, следовательно, характерен определенный уровень активности ферментов антиоксидантной защиты. С учетом значительных изменений скорости СРО и их патологической значимости при многих заболеваниях представляло интерес выяснить возможность антиоксидантных ферментов эритроцитов здоровых детей, подростков и взрослых противостоять разрушающему действию продуктов СРО при изменении его скорости путем введения *in vitro* прооксидантов (используя среду Фентона).

Поэтому целью нашего исследования явилось изучение возрастных особенностей изменения активности ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов в условиях индуцированного окислительного стресса в системе *in vitro*.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований служила кровь детей 8–10 лет (мальчики), подростков 13–14 лет и взрослых 30–40 лет (мужчины). Гемолизат эритроцитов получали по методу Драбкина (Drabkin, 1949). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу M.Nishikimi, N.A.Rao, K.Yagi (Nishikimi et al., 1972), активность каталазы – по методу М.А.Королюка и др. (Королюк и др., 1988), активность глутатионредуктазы определяли по изменению скорости окисления НАДФ•Н₂ (Юсупова, 1989). Окислительный стресс индуцировали средой Фентона (Дубинина и др., 1995), инкубируя в ней эритроциты в течение 1 и 2 часов. Цифровые данные, полученные в результате исследований, статистически обрабатывали методом малых выборок (Бейли, 1964).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о том, что с возрастом активность отдельных внутриэритроцитарных ферментов повышается (табл. 1). Активность СОД в гемолизате эритроцитов подростков и взрослых превышала уровень ее активности у детей в 1,5 и 2,1 раза соответственно. Сравнительный анализ активности СОД в гемолизате эритроцитов подростков и взрослых показал преобладание активности СОД у последних в 1,4 раза. Активность каталазы у подростков и взрослых превышала таковую у детей в 1,5 и в 1,3 раза соответственно.

Активность глутатионредуктазы была максимальной в гемолизате эритроцитов детей и с возрастом понижалась на 40% и 8% соответственно. А поскольку в гемолизате эритроцитов детей ранее нами был отмечен наиболее высокий уровень процессов перекисного окисления липидов и недостаточно высокая активность СОД и каталазы, то, возможно, повышенный уровень активности

глутатионредуктазы относительно групп 13–14- и 30–40-летних является компенсаторной реакцией клетки в условиях повышенных концентраций активных форм кислорода (Гидулянова, 2007).

В условиях индуцированного окислительного стресса в гемолизате эритроцитов детей и подростков активность всех изученных антиоксидантных ферментов возростала после 1-часовой инкубации эритроцитов со средой Фентона. Возможно, именно в этих временных рамках происходит проявление адаптационных механизмов, направленных на поддержание эритроцитов в состоянии их нормального функционирования в условиях повышенных концентраций активных форм кислорода.

Таблица 1.
Активность антиоксидантных ферментов в гемолизате эритроцитов детей, подростков и взрослых в условиях индуцированного окислительного стресса ($M \pm m$)

Обследуемые группы						
	Дети 8–10 лет		Подростки 13–14 лет		Взрослые 30–40 лет	
	Показатели при инкубации в среде Фентона	Показатели при инкубации с физ. раствором (без среды Фентона)	Показатели при инкубации в среде Фентона	Показатели при инкубации с физ. раствором (без среды Фентона)	Показатели при инкубации в среде Фентона	Показатели при инкубации с физ. раствором (без среды Фентона)
	Супероксиддисмутаза, степень торможения восстановления тетразолия нитросиноего, %					
Контроль	31,81±4,99		47,06±2,73**		66,187±7,32*** **	
1 час инкубации	52,09±3,30*	33,163±4,00	56,20±3,004*	48,32±3,273	27,278±3,25*	65,004±4,976
2 часа инкубации	40,45±4,05	30,371±3,225	46,20±4,40	46,154±4,85	7,499±0,919*	65,109±4,675
	Каталаза, (мМ/мин · 1М Нb)					
Контроль	0,756±0,107		1,117±0,153		0,945±0,099	
1 час инкубации	1,634±0,224*	0,746±0,068	2,360±0,302*	1,125±0,138	0,634±0,034	0,926±0,096
2 часа инкубации	1,207±0,142*	0,764±0,090	1,227±0,137	1,123±0,149	0,497±0,047*	0,921±0,083
	Глутатионредуктаза, (моль НАДФН / с · 1М Нb)					
Контроль	2,355±0,303		1,413±0,108**		2,172±0,145***	
1 час инкубации	2,962±0,335	2,340±0,267	1,501±0,195	1,425±0,153	1,558±0,213*	2,224±0,165
2 часа инкубации	2,641±0,331	2,356±0,280	1,288±0,137	1,438±0,165	0,582±0,060*	2,165±0,210

Примечание:

* – $p < 0,05$ к контролю;

** – $p < 0,05$ показателей подростков и взрослых относительно детей;

*** – $p < 0,05$ показателей взрослых относительно подростков.

В гемолизате эритроцитов 30–40-летних, несмотря на наиболее высокий уровень содержания антиоксидантных ферментов в контроле относительно двух других возрастных групп, как в условиях 1-часовой, так и 2-часовой инкубации эритроцитов в среде Фентона отмечено снижение активности данных ферментов ($p < 0,05$). Отсутствие компенсаторного ответа эритроцитов взрослых в исследуемых временных рамках, проявляющегося в увеличении активности антиоксидантных ферментов, возможно, связано с тем, что данная реакция проявляется на более ранних этапах воздействия повышенных концентраций активных форм кислорода.

При исследовании активности антиоксидантных ферментов в условиях отсутствия окислительных агентов (при инкубации эритроцитов в физ. растворе в течение 1 и 2 часов) достоверных различий относительно контрольных показателей отмечено не было.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что у детей и подростков в нормальных физиологических условиях активность ферментов антиоксидантной системы ниже, чем у взрослых. В условиях увеличения концентрации активных форм кислорода (при использовании среды Фентона) в эритроцитах детей и подростков происходит активация ферментов системы антиоксидантной защиты, что может свидетельствовать о компенсаторном ответе эритроцитов и о

более высокой степени резистентности эритроцитов данных возрастных групп к воздействию активных форм кислорода.

Возможной причиной различий в ответе ферментов антиоксидантной системы на повышенную концентрацию активных форм кислорода в эритроцитах различных возрастных групп может являться изменение изоферментного спектра в процессе онтогенеза, а также различная чувствительность к свободнорадикальному окислению изученных ферментов.

Выводы

1. В гемолизате эритроцитов детей, подростков и взрослых происходило увеличение активности СОД и каталазы с возрастом. Активность глутатионредуктазы с возрастом снижалась.
2. В условиях модуляции активности антиоксидантных ферментов под влиянием среды Фентона, в гемолизате эритроцитов детей и подростков происходило увеличение активности ферментов в условиях 1-часового воздействия активных форм кислорода. В гемолизате эритроцитов взрослых в условиях 1- и 2-часовой экспозиции в среде Фентона происходило снижение активности всех изученных ферментов.

Список литературы

Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: Мир, 1964. – 260с.

Вьюшина А.В. Влияние пренатального стресса на процессы окислительной модификации белков и активности Zn-Cu-супероксиддисмутазы в головном мозге крыс. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 2006. – 22с.

Гидулянова К.В. Возрастные особенности процессов пероксидации в эритроцитах в условиях их стимуляции в системе *in vitro* // Матеріали 2 міжнародної конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери». – Харьков, 2007. – С. 27–28.

Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т.41, №1. – С. 24–25.

Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: Изд-во Наука, 2001. – С. 25–80.

Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.

Подколзин А.А., Мегреладзе А.Г., Донцов В.И. и др. Система антиоксидантной защиты организма и старение // Профилактика старения. – 2000. – Вып.3. – С. 35–40.

Юрков Ю.А., Банкова В.В., Хамидова М.М. и др. Свободнорадикальное окисление липидов и устойчивость к гемолизу эритроцитов здоровых и больных детей // Вопр. мед. химии. – 1984. – Т.30, вып.4. – С. 101–105.

Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1989. – №4. – С. 19–21.

Abzhandadze T.I., Kvezereli-Kopadze A.N., Dzhaparidze E.Sh. et al. The role of oxidative metabolism in pathogenesis of hyperbillirubinemia in infants // Georgian Med. News. – 2006. – Vol.136. – P. 77–80.

Drabkin D.A. Simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949. – Vol.21. – P. 224–226.

Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methasulphate and molecular oxygen // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1972. – Vol.46, №2. – P. 849–857.

Rizvi S.I., Jha R., Maurya P.K. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging // Rejuvenation Res. – 2006. – Vol.9, №4. – P. 470–474.

Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. – 2005. – Vol.12 (10). – P. 1161–1208.

Вікові особливості модуляції активності антиоксидантних ферментів при індукованому окислювальному стресі Х.В.Гідулянова

Досліджено активність антиоксидантних ферментів у гемолізаті еритроцитів дітей, підлітків та дорослих у нормі і при індукованому окислювальному стресі. Для СОД і каталази визначено зростання активності з віком. Зміна активності глутатионредуктази мала протилежну спрямованість. В умовах окислювального стресу, викликаного середовищем Фентона, при 1-годинній інкубації визначена компенсаторна реакція еритроцитів двох вікових груп – дітей та

підлітків. В еритроцитах дорослих 30–40 років відзначено зниження активності всіх досліджених ферментів в умовах даного експерименту.

Ключові слова: *окислювальний стрес, антиоксидантні ферменти, онтогенез.*

**Age features of modulation of antioxidative enzymes activity at induced oxidizing stress
K.V.Gidulyanova**

The activity of antioxidative enzymes in hemolysate of children, adolescents and adults erythrocytes in the norm and in the conditions of induced oxidative stress has been established. The activity of superoxidodismutase and catalase increased with age. Changes of glutathionereductase activity had an opposite orientation. In the conditions of oxidative stress, provoked by Fenton solution at 1-hour incubation compensatory reaction of erythrocytes of 2 age groups – children and adolescents has been established. At adults of 30-40 years old the decrease in the activity of studied enzymes in the conditions of this experiment has been marked.

Key words: *oxidative stress, antioxidative enzymes, ontogenesis.*

Представлено: В.І.Жуковим
Рекомендовано до друку: П.А.Каліманом