

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В МИОКАРДЕ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В. Н. ШВЕЦ¹, В. В. ДАВЫДОВ²

¹Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
²Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины, Харьков;
 e-mail: davydov@kharkov.com

С целью выяснения причин повышения с возрастом организма чувствительности сердца к стрессу в настоящей работе было предпринято изучение показателей, отражающих функционирование цикла Кребса в сердце взрослых и старых крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации. Исследования показали, что при иммобилизационном стрессе в митохондриях миокарда у взрослых и старых крыс возникают компенсаторные сдвиги со стороны биоэнергетических процессов, способствующие ограничению стрессорного снижения энергетического обеспечения сердечной мышцы. У старых крыс они связаны с поддержанием высокой скорости превращений в цикле Кребса и повышением интенсивности тканевого дыхания, а у взрослых животных — с усилением роли FAD-зависимых процессов в тканевом дыхании.

Ключевые слова: старение, миокард, иммобилизационный стресс, цикл Кребса.

При старении происходит снижение уровня энергетического обеспечения тканей внутренних органов [1–3], что предопределяет уменьшение их устойчивости к стрессорным воздействиям [4,5] и, соответственно, повышение уровня распространенности сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с возрастной патологией [6]. Особую роль в энергетическом обмене занимают окислительно-восстановительные превращения в цикле трикарбонных кислот, обеспечивающие процесс тканевого дыхания субстратом. Однако, несмотря на это, до настоящего времени все еще не установлены особенности их изменения в миокарде при стрессе в зависимости от возраста организма.

Целью настоящей работы явилось изучение показателей, отражающих функционирование цикла Кребса в сердце взрослых и старых крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу.

Материалы и методы

Работа выполнена на 83 крысах-самцах линии Вистар. Использовали животных двух возрастных групп: взрослые (10–12 мес) и старые — (22–25 мес), которых, в свою очередь, делили на 2 подгруппы: 1 — интактные и 2 — крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 мин.

Эффективность воспроизведения стресса контролировали на основании измерения в крови концентрации 11-оксикортикостероидов и адреналина.

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Из сердца выделяли ткань миокарда левого желудочка, которую гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма со средой выделения, содержащей 0,25 М сахарозы и 0,01 М трис (рН 7,4). Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g. Полученный супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 10 000 g. Осадок митохондрий двукратно отмывали средой выделения при помощи центрифугирования в течение 20 мин при 10 000 g. Отмытый осадок использовали в работе в качестве митохондриальной фракции. Фракционирование проводили при 4–6 °С.

В суспензии митохондрий определяли активность сукцинатдегидрогеназы, NAD-зависимой малатдегидрогеназы, NAD⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы [7] и цитохромоксидазы [8].

В экстрактах проб замороженного в жидком азоте, а затем размороженного миокарда проводили определение концентрации янтарной [9], яблочной и щавелевоуксусной [10] кислот, а также окисленного и восстановленного NAD [10].

Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных нами исследований (табл. 1) свидетельствуют о том, что в митохондриях миокарда старых крыс происходит повышение активности сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы на 48 и 34% соответственно по сравнению с их величиной у взрослых животных. При этом активность NAD^+ -зависимой изоцитратдегидрогеназы остается на уровне ее значений у взрослых крыс. Сдвиги в активности ферментов цикла трикарбоновых кислот с увеличением возраста крыс сопровождаются уменьшением содержания щавелевоуксусной кислоты в сердечной мышце на 36% по сравнению с ее исходным уровнем, хотя концентрация яблочной и янтарной кислот в сердце старых крыс остается на уровне таковой у взрослых животных. В то же время в миокарде старых крыс снижается содержание восстановленного NAD на 66% по сравнению с таковым у взрослых животных (табл. 2).

После 30-минутной иммобилизации у взрослых крыс происходит повышение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердечной мышцы на 45% по сравнению с ее величиной у интактных животных данной возрастной группы. При этом активность NAD^+ -зависимых дегидрогеназ остается на ее

исходном уровне. В то же время у взрослых иммобилизованных крыс на 31% увеличивается содержание янтарной кислоты, хотя концентрация щавелевоуксусной и яблочной кислот при этом не изменяется. Возникающие сдвиги дополняются уменьшением содержания восстановленного NAD в сердце на 69% по сравнению с его исходным значением.

У старых крыс 30-минутная иммобилизация сопровождается снижением активности малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы на 19 и 33% соответственно по сравнению с их величиной у интактных животных. При этом активность сукцинатдегидрогеназы остается на исходном уровне. Изменения активности ферментов цикла Кребса у старых, подвергнутых иммобилизации крыс не сопровождаются появлением сдвигов в содержании янтарной, яблочной и щавелевоуксусной кислот в миокарде, в то же время у них увеличивается концентрация восстановленного NAD в сердце на 76% по сравнению с ее исходной величиной.

Изменения изученных показателей, возникающие в миокарде взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе, сопровождаются повышением активности цитохромоксидазы в митохондриях соответственно на 88 и 132% по сравнению с величиной аналогичного показателя у интактных взрослых и старых животных (рисунок).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в миокарде старых крыс возникают условия для ограничения скорости окислительно-восстановительных превращений в цикле трикарбоновых кислот. Этому способ-

Таблица 1. Активность ферментов цикла трикарбоновых кислот и величина показателей состояния энергетического обеспечения миокарда взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе ($M \pm m$)

Показатель	Взрослые крысы:		Старые крысы:	
	интактные	стресс	интактные	стресс
Сукцинатдегидрогеназа	23,7 ± 2,6	34,5 ± 3,7*	35,0 ± 3,9**	29,6 ± 1,6
NAD^+ -зависимая малатдегидрогеназа	116 ± 16	132 ± 10	156 ± 3,9**	127 ± 6*
NAD^+ -зависимая изоцитратдегидрогеназа	3,6 ± 0,8	6,0 ± 1,5	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,5*
Янтарная кислота, мкмоль/г ткани	9,8 ± 0,4	12,8 ± 0,6*	10,8 ± 0,8	12,2 ± 0,6
Яблочная кислота, нмоль/г ткани	272 ± 22	245 ± 17	258 ± 17	255 ± 16
Щавелевоуксусная кислота, нмоль/г ткани	33 ± 3	21 ± 5*	21 ± 4**	24 ± 4

Тут и в табл. 2 в экспериментах использовали по 5–6 крыс. Активность ферментов выражена в нмоль/мин на 1 мг белка: *данные достоверны по отношению к интактным животным данной возрастной группы и ** по отношению к интактным взрослым животным, $P < 0,05$

Таблица 2. Содержание окисленного и восстановленного NAD (нмоль/г ткани) в миокарде взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе ($M \pm m$)

Показатель	Взрослые крысы:		Старые крысы:	
	интактные	стресс	интактные	стресс
NAD-окисленный	889 ± 50	966 ± 73	1054 ± 104	1080 ± 34
NAD-восстановленный	62 ± 4	19 ± 3*	21 ± 4**	37 ± 4*

ствует, в частности, уменьшение содержания в нем шавелевоуксусной кислоты. Анализируя полученные данные, можно отметить, что это изменение не связано с уменьшением скорости окисления яблочной кислоты в малатдегидрогеназной реакции. Причиной возникновения этого сдвига является повышение скорости ее утилизации по другим метаболическим путям, в том числе в реакции трансаминирования с глутаминовой кислотой, в результате которой образуется аспарат.

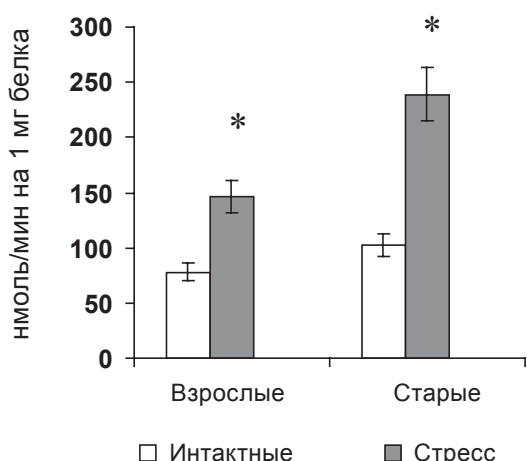
Следствием уменьшения скорости окислительно-восстановительных превращений в цикле Кребса является снижение восстановленности пула NAD в миокарде и, тем самым, ограничение обеспечения дыхательной цепи митохондрий восстановленным NAD. В подобной ситуации поддержание необходимого уровня АТФ в клетках миокарда может обеспечиваться за счет компенсаторного повышения роли FAD-зависимого окисления янтарной кислоты в процессе тканевого дыхания.

Изменение скорости окислительно-восстановительных превращений в цикле три-

карбоновых кислот в митохондриях миокарда старых крыс свидетельствует о формировании у них так называемого «напряжения» в состоянии биоэнергетических процессов в сердце. Это, в свою очередь, предопределяет появление с возрастом животных особенностей в изменении их состояния в условиях повышения потребности сердечной мышцы в АТФ при стрессе. Проведенные в данном направлении исследования показали, что в миокарде взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе возникают различные сдвиги в величине показателей, отражающих состояние превращений в цикле Кребса.

В сердце взрослых крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации, снижается концентрация шавелевоуксусной кислоты, что предопределяет ограничение скорости окислительно-восстановительных процессов в цикле трикарбоновых кислот. Следствием этого становится уменьшение продукции восстановленного NAD и соответственно его содержания в миокарде. Возникающие изменения способствуют уменьшению скорости тканевого дыхания, обуславливая тем самым стрессорное снижение уровня энергетического обеспечения сердца [2, 11]. Параллельно с этим в миокарде взрослых крыс возрастает роль FAD-зависимых процессов в тканевом дыхании и повышается активность цитохромоксидазы. Подобные изменения, по всей вероятности, имеют компенсаторный характер и направлены на поддержание уровня энергетического обеспечения кардиомиоцитов [12,13].

В отличие от взрослых крыс в сердце старых животных при иммобилизационном стрессе снижение содержания шавелевоуксусной кислоты не происходит. По этой причине, даже в условиях частичного ингибирования исследованных NAD⁺-зависимых дегидрогеназ (малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы), у них сохраняется возможность для поддержания исходной интенсивности превращений промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в митохондриях. Подтверждением этого является факт повышения уровня



Активность цитохромоксидазы (нмоль/мин на 1 мг белка) митохондрий миокарда взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе. * $P < 0,05$ по отношению к интактным животным

восстановленного NAD в сердце крыс данной группы.

Наряду с увеличением концентрации восстановленного NAD в миокарде старых иммобилизованных животных происходит выраженная активация цитохромоксидазы, что предопределяет повышение интенсивности тканевого дыхания. Подобный сдвиг способствует ограничению в условиях стресса понижения уровня АТФ в кардиомиоцитах [2, 14].

Таким образом, при иммобилизационном стрессе в митохондриях миокарда у взрослых и старых крыс возникают компенсаторные изменения в биоэнергетических процессах, которые позволяют ограничить величину снижения в условиях стресса уровня энергетического обеспечения сердечной мышцы. При этом у старых крыс эти изменения связаны с поддержанием высокой скорости превращений в цикле Кребса и повышением интенсивности тканевого дыхания, а у взрослых животных — с повышением роли FAD-зависимых процессов в тканевом дыхании.

Феномен стрессорной стимуляции окисления янтарной кислоты в митохондриях хорошо известен [12,13]. Его возникновение имеет характер адаптивной реакции, направленной на обеспечение дыхательной цепи митохондрий восстановленным FAD в условиях нарушения функционирования при стрессе NAD⁺-зависимых дегидрогеназ. Ограничение этого механизма при старении может выступать в качестве одного из проявлений нарушения адаптивных процессов в миокарде при стрессе, так как компенсация повышенных энергетических потребностей сердечной мышцы за счет усиления тканевого дыхания имеет ограниченные возможности. Адаптивное значение стимуляции тканевого дыхания существенно снижается в условиях тканевой гипоксии. В этой связи можно думать о том, что в условиях

воздействия на организм более сильных стрессоров, чем кратковременная иммобилизация, у старых животных будут возникать проявления дезадаптации. Однако высказанное предположение требует экспериментальной проверки, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЦИКЛУ ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ У МІОКАРДІ СТАРИХ ТА ДОРОСЛИХ ЩУРІВ У РАЗІ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

В. М. Швець¹, В. В. Давидов²

¹Запорізький державний медичний університет, Україна;

²Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків АМН України, Харків;
e-mail: davydov@kharkov.com

З метою з'ясування причин збільшення з віком чутливості серця до стресу в роботі було проведено вивчення показників, що відображають функціонування циклу Кребса в серці старих та дорослих щурів, підданих 30-хвилинній імобілізації. Досліди показали, що за імобілізаційного стресу в митохондриях у дорослих та старих щурів виникають компенсаторні зміни в біоенергетичних процесах, що сприяють обмеженню стрессорного зниження енергетичного забезпечення серцевого м'яза. У старих щурів вони пов'язані з підтримкою високої швидкості перетворень у циклі Кребса та підвищенням інтенсивності тканинного дихання, а у дорослих тварин — із підсиленням ролі FAD-залежних процесів у тканинному диханні.

Ключові слова: старіння, міокард, імобілізаційний стрес, цикл Кребса.

PECULIARITIES OF TRICARBXYLIC ACID CYCLE FUNCTIONING IN THE MYOCARDIUM OF ADULT AND OLD RATS IN THE CASE OF IMMOBILIZATION STRESS

V. N. Shvets¹, V. V. Davydov²

¹Zaporozhie State Medical University, Ukraine;
²Institute of Children and Adolescents Health Care;
 Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov;
 e-mail: davydov@kharkov.com

S u m m a r y

Indices showing Krebs cycle functioning in the hearts of adult and old rats subjected to 30-minutes immobilization were studied in order to find out the causes of age-related increase of heart sensitivity to stress. The studies have shown that compensatory changes of energy metabolism promoting limitation of stress-induced decrease of energy supply of the heart muscle took place in the myocardium mitochondria in adult and old rats during immobilization stress. The changes are associated with maintenance of high rate of red-ox reactions in the Krebs cycle and increase of myocardium respiration in old rats, and with an increase of the FAD-dependent processes in tissue respiration in adult rats.

Key words: ageing, myocardium, immobilization stress, Krebs cycle.

1. *Богацкая Л. Н., Ступина А. С., Калиман П. А., Парина Е. В. // Старение: механизмы,*

- патология, образ жизни. — Киев, 1985. — С. 34–44.
2. *Davydov V. V., Shvets V. N. // Gerontology. — 2002. — 48. — P. 81–83.*
 3. *Nohl H., Staniek K., Gille L. // Exp. Gerontol. — 1997. — 32, N 4–5. — P. 485–500.*
 4. *Lakatta E. G. // Circ. Res. — 2001. — 88. — P. 984–986.*
 5. *Lakatta E. G., Sollott S. J., Pepe S. // Novartis Found. Symp. — 2001. — 235. — P. 172–196.*
 6. *Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. — К.: Наук. думка, 1994. — 320 с.*
 7. *Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. / Методы биологии развития. — М.: Наука, 1974. — С. 346–364.*
 8. *Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — P. 429–430.*
 9. *Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г. / Методы биохимических исследований. — Л.: ЛГУ, 1982. — С. 207–210.*
 10. *Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г., Ермолаева Л. П. / Методы биологии развития. — М.: Наука, 1974. — С. 415–433.*
 11. *Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 270 с.*
 12. *Кондрашова М. Н., Григоренко Е. В. Защита от стресса на уровне митохондрий. — Пушино, 1981. — 15с.*
 13. *Маевский Е. И., Гришина Е. В., Розенфельд А. С. и др. // Биофизика. — 2000. — 45. — С. 509–513.*
 14. *Швец В. Н. // Экспериментальна і клінічна медицина. — 2007. — 1. — С. 59–62.*

Получено 09.01.2008