

УДК: 57.017.6+612.013+612.68

Козовий Р. В., Ковальчук Л. Є.

ОЦІНКА ЗНАЧУЩОСТІ ВПЛИВУ ЧИННИКІВ РІЗНОГО ҐЕНЕЗУ НА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ І ДОВГОЛІТТЯ

ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”

Обстежено 486 довгожителів (основна група) та 297 людей віком від 36 до 60 років, у родовах яких не було довгожителів (група порівняння). Проведено кореляційний аналіз між біохімічними, цитогенетичними, морфометричними та спектрометричними параметрами досліджуваних груп. Відібрано 29 кількісних показників активності стану глутатіонової системи (ферменти глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази), окисної модифікації білків (ОМБ) у сироватці крові, функціонального стану геному епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота, лімфоцитів, нейтрофільних гранулоцитів. Аналіз кореляцій довів важливу роль ферментів ендogenous антиоксидантної глутатіонової системи у підтриманні структурно-функціональної стабільності клітин і організму довгожителів. У основній групі встановлено прямі дуже сильні взаємозв'язки між ОМБ основного та нейтрального характеру, активністю ферментів глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та денситометричними, цитогенетичними індексами; у людей групи порівняння виявлено більш виражену окиснювальну деструкцію білків, що зумовлює велику частоту мікроядер, хромосомних аберацій, ядер з максимальним ступенем компактизації хроматину, що може бути одною з причин інкактивації ферментів глутатіонової системи.

Ключові слова: кореляційний аналіз, довгожителі, глутатіонова система, окисні модифікації білків, структурно-функціональний стан геному.

Публікація є фрагментом науково-дослідної роботи “Цитогенетичні механізми формування здоров'я населення та розробка заходів його покращення” (номер держреєстрації 01/3U000768), яка фінансується МОЗ України з коштів держаного бюджету

Вступ

Останніми роками все більша увага приділяється клітинним, цитогенетичним і біохімічним факторам старіння. Це зумовлено тим, що з віком знижується стійкість організму до гіпоксії і, як наслідок, розвивається гіпоксичне порушення гомеостазу [1]. Першочергово зміни про- і антиоксидантної систем проявляються на клітинному рівні. При старінні відбувається порушення балансу між інтенсивністю утворення вільних радикалів і активністю антиоксидантної системи. Оксидантний стрес веде до збільшення продукції в тканинах активних форм кисню (АФК), що зумовлює зниження адаптивних можливостей у літніх людей [2]. Посилення переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і білків (ПОБ) призводить до порушення функції клітинних мембран, утворення та відновлення органел, нуклеосомної природи хромосомного апарату. Отже, вищеописані процеси пов'язані зі змінами структури клітин, її морфометричних характеристик, а особливо перебудови хроматину, експресії та функції генів. Останнє детермінує формування фенотипових ознак, зокрема синтезу поліпептидів, ферментів [3].

Тому оцінка цитогенетичного статусу організму є невідкладною складовою у створенні цілісної картини клітинних аспектів старіння.

Мета дослідження

Встановлення взаємозв'язків між морфофункціональними, генетичними, біохімічними характеристиками різних соматичних клітин довгожителів, порівняно з людьми, у родовах яких не було осіб, що

прожили більше 90 років.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження слугували епітеліоцити слизової оболонки порожнини рота (СОРП), лімфоцити периферійної крові (ЛПК), нейтрофільні гранулоцити периферійної крові (НГПК), сироватка крові 486 довгожителів (основна група) та 297 людей віком від 36 до 60 років, у родовах яких не було довгожителів (група порівняння). Забір матеріалу, виготовлення та аналіз препаратів здійснювали згідно методик, описаних у наших попередніх роботах [4].

Стан глутатіонової системи, як компоненту ендogenous антиоксидантної системи (АОС), оцінювали за активністю ферментів глутатіон-S-трансферази (ГТ), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР). Продукти окисної модифікації білків (ОМБ) у сироватці крові досліджували відповідним методом [О.Ю. Дубініної]. Функціональний стан геному епітеліоцитів СОРП, ЛПК та НГПК встановлювали за індексами хроматизації (ІХ), ядерцевим (ЯІ), морфологічно змінених ядер (МЗЯ), гетеропікнотичної Х-хромосоми (СХ). Структурні зміни хромосомного апарату визначали за частотою мікроядер (МЯ) в СОРП, хромосомними абераціями (ХА), асоціаціями акроцентричних хромосом (ААХ) у метафазних пластинках ЛПК [5]. З морфометричних параметрів соматичних клітин вибрано площу та периметр ядер, із спектрометричних – оптичну та інтегральну щільність ядер епітеліоцитів СОРП, ЛПК.

Для кореляційного аналізу відібрано 29 кількісних морфологічних, генетичних, біохімічних показників. Для проведення кореляційного аналізу отриманих кількісних характеристик використано метод С. Н. Лапач і співавт. [6].

Результати та їх обговорення

Кореляційним аналізом встановлено наявність чотирьох дуже сильних позитивних зв'язків у довгожителів ($r=0,90$). Перший з них – між ступенем компактизації хроматину в ядрах епітеліоцитів СОРП і ЛПК, довів узгодженість процесів експресії генів у різних клітинах і достатній рівень регуляції біосинтезу поліпептидів. Закономірними виявилися кореляції між різними фракціями ОМБ: ОМБ₃₅₆ і ОМБ₃₇₀, ОМБ₃₅₆ і ОМБ₄₃₀, ОМБ₃₇₀ і ОМБ₄₃₀. Наявність лише одної дуже сильної кореляції ($r=0,90-0,99$) у представників контрольної групи (між ОМБ₃₇₀ і ОМБ₄₃₀) може свідчити про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму [7]. На противагу, у довгожителів ступінь окиснювальної деструкції білкової молекули порівняно менший.

Важливу роль у продовженні тривалості життя відіграють, за даними кореляційного аналізу, оптимальні зв'язки між ферментами глутатіонової системи і показниками окиснення білків. У довгожителів виявлено п'ять значних кореляцій ($r=0,5-0,69$), дві з яких обернені. Закономірним був обернений взаємозв'язок між активністю ГТ і ГП. Відомо, що ГТ бере участь у першому етапі детоксикації, каталізує взаємодію ксенобіотиків з глутатіаном. Таким чином ГТ запобігає пошкодженню ДНК, мітохондрій, інших життєво важливих органел від дії шкідливих речовин [8]. Подібну функцію виконує і ГП, який не лише попереджає накопичення гідроперексидів, а й активно їх відновлює [9]. Сумісно дані два ферменти гальмують подальше прогресування пероксидації, поширення неферментних реакцій накопичення вторинних метаболітів. Ймовірно, однакоправленість дії ГП і ГТ зумовлює обернений зв'язок між їх активністю.

Важливим доказом високого рівня активності детоксикації ксенобіотиків у довгожителів є наявність двох значних позитивних кореляцій між ГП та ступенем конденсації хроматину в епітеліоцитах СОРП і ЛПК. Збільшення в ядрах цих клітин евхроматинових фракцій може зумовлювати активацію транскрипції та, відповідно, наступних етапів реалізації спадкової інформації, зокрема, синтезу поліпептиду ферменту ГП.

Відомо, що окиснювальна деструкція білків – одна з важливих причин інактивації ферментів, зміни структурної організації білків при стані окиснювального стресу [10]. Тому відсутність значних кореляцій між ОМБ, ферментами глутатіонової системи та цитоморфометричними і денситометричними показниками, на противагу

до таких у контрольній групі (11 кореляцій) опосередковано вказує на високий рівень ендogenous антиоксидантів у довгожителів. Заслугове на увагу обернений взаємозв'язок між ОМБ₅₃₀ і максимальною оптичною щільністю ядер СОРП довгожителів. Переважання нейтральних фракцій ОМБ може спостерігатися в білках цитоплазми і клітинної мембрани. Змінені інтегральні або периферійні білки, які формують структуру останньої, не дають змоги фракціям конденсованого хроматину з'єднуватися з цитолемою. Тому гетерохроматин локалізується окремими грудками в каріоплазмі, що збільшує показник максимальної оптичної щільності ядра.

Порівняльний аналіз взаємозв'язків між 29 показниками осіб двох досліджуваних груп показав, що у довгожителів кількість кореляцій помірної сили ($r = 0,30-0,49$) була меншою (34), ніж у людей контрольної групи (51). Визначальною особливістю якості зв'язків у довгожителів була участь ферментів глутатіонової системи у 44,12 % різних кореляцій. На противагу, у людей групи порівняння виявлена тільки одна кореляція серед усіх (1,96 %), що мала відношення до ГР – між активністю ГР та ОМБ₃₅₆.

Потребують детального пояснення типи взаємозв'язків між ферментами глутатіонової системи та цитоморфометричними і цитогенетичними показниками. Збільшення периметру ядер за рахунок інвагінацій каріолеми, посилення оптичної щільності ядер може бути відображенням гетерохроматизації. Це не сприяє синтезу поліпептидів і, відповідно, ферментів ГП і ГТ, на що вказують від'ємні кореляції між зазначеними показниками. Однак, регуляція експресії генів ГП може бути забезпечена за рахунок оптимального контролю сайтів Х-хромосоми, що засвідчено позитивним взаємозв'язком ($r=0,30-0,49$). Встановлено також позитивний взаємозв'язок між активністю ГП та здатністю акроцентричних хромосом утворювати асоціації. Відомо, що найбільш інформативним цитогенетичним показником імунореактивності лімфоцитів у різних фазах всіх видів імунної відповіді в організмі людини на момент дослідження є частота ААХ. Це зумовлено тим, що важлива функція акроцентричних хромосом полягає в утворенні ядерця. В останньому відбувається синтез рРНК, з якої в цитоплазмі формуються рибосоми. Окрім того, з активністю ядерця пов'язані транспорт різних видів РНК з ядра в цитоплазму. Тобто, активність біосинтетичних процесів у клітині безпосередньо залежні від функції ядерцевих організаторів. Можна припустити, що частота ААХ у лімфоцитах відображає функціональний стан клітини в передуючій інтерфазі. При цьому, за нашими даними, цей показник досягав максимуму у людей зрілого віку і знижувався в похилому віці. Оскільки в довгожителів імовірність утворення ААХ більша, ніж у людей

групи порівняння, активність біосинтетичних процесів ферменту ГП також вища. Даний факт може бути ще одним доказом функціональної активності ферментів глутатіонової системи як складової ендogenous антиоксидантного захисту в довгожителів.

Цитогенетичними маркерами достатньої продукції ГР і ГТ є встановлені нами позитивна кореляція між активністю ГР та ІХ і, відповідно, від'ємна кореляція між ГТ і максимальною оптичною щільністю ядра. Гетерохроматизація асоціюється зі зниженням здатності деспіралізації ДНК та першого етапу експресії генів [11]. Саме з таких позицій можна розглядати обернені взаємозв'язки між максимальною оптичною щільністю та ІХ, позитивні – між діапазоном оптичної щільності та ІХ різних соматичних клітин. Варто зазначити про узгодженість деконденсації хроматину з показником СХ у лімфоцитах, нейтрофілах і епітеліоцитах СОРП, що засвідчили чотири позитивні кореляції. Такої універсальної оптимально-адекватної взаємодії між активністю еухроматину та регулярною функцією Х-хромосоми не виявлено в осіб контрольної групи. У людей, в родовах яких не було довгожителів, між вищезазначеними показниками спостерігалися від'ємні кореляції. Водночас 17 взаємозв'язків зареєстровано між ОМБ і денситометричними, цитогенетичними індексами. Чим більше з'являлося ОМБ, тим вираженішими були зміни структури хроматину, ядер. Поява МЯ в лімфоцитах, епітеліоцитах СОРП також залежала від активності ОМБ₃₇₀ та ОМБ₄₃₀, відповідно. При цьому достатньої кількості ГР і ГП, які попереджають накопичення гідроперексидів, а ГТ ще й відновлює останні [8], у людей контрольної групи не встановлено.

Отже, окиснювальна деструкція білків – одна з можливих причин інкактивації ферментів глутатіонової системи, які належать до ендogenous чинників АОС. ОМБ зумовлюють зміни структури та функції клітинних компонентів, що демонструють зростання частоти МЯ, патологічних ядер, максимальної оптичної щільності ядер, гетерохроматизації. Такі процеси супроводжуються дисрегуляторним впливом гетеропікнотичної Х-хромосоми у людей похилого віку.

У довгожителів достовірно переважала активність ферментів глутатіонової системи. ГТ знешкоджують сполуки майже всіх класів: різні токсичні речовини, канцерогени, мутагени, цитостатики, пестициди, фарби, ліки тощо. Речовини, з'єднані з ГТ, поступово інактивуються і виводяться не пошкоджуючи клітину. ГР необхідний для відновлення окиснювального глутатіону, а разом із ГП підтримують певний рівень відновленого глутатіону.

На противагу до людей похилого віку, у довгожителів активність ГТ не знижена. Можна припустити, що саме тому в соматичних клітинах

довгожителів спостерігалася невелика кількість змінених мітохондрій, елементів комплексу Гольджі та ендoplазматичної сітки. Пошкодженню цих органел запобігала ГТ, що значно збільшувало стійкість клітин і цілого організму. Сумісно ферменти глутатіонової системи попереджають подальше прогресування пероксидації, накопичення вторинних метаболітів.

Висновки

1. Кореляційним аналізом 29 кількісних показників доведено важливу роль ферментів ендogenous антиоксидантної глутатіонової системи у підтриманні структурно-функціональної стабільності клітин і організму довгожителів.

2. У довгожителів встановлено прямі дуже сильні взаємозв'язки між окисними модифікаціями білків основного та нейтрального характеру, активністю ферментів ГТ, ГП, ГР та денситометричними, цитогенетичними індексами; у людей групи порівняння виявлено більш виражену окиснювальну деструкцію білків, що зумовлює велику частоту МЯ, ХА, ядер з максимальним ступенем компактизації хроматину, що може бути одною з причин інкактивації ферментів глутатіонової системи.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягають у кількісному визначенні внеску ендogenous і екзогенних чинників

Література

1. Асанов Э.О. Возрастные особенности интенсивности перекисного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы при гипоксическом стрессе / Э.О. Асанов, М.В. Беликова // Пробл. старения и долголетия. – 2006. – 15, № 4. – С. 285–290.
2. Ткачук С.С. [Порівняльний аналіз впливу двобічної каротидної ішемії-реперфузії на стан окислювальної модифікації білків у структурах мозку дорослих та старих щурів](#) / С.С. Ткачук, Т.І. Бойчук // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – Том IX, № 4 (34). – С. 65-69.
3. [Delphine Grivet](#) Molecular Footprints of Local Adaptation in Two Mediterranean Conifers / [Delphine Grivet](#), [Federico Sebastiani](#), [Ricardo Alia](#) [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2010. – Vol. 28 (1) – P. 101-116.
4. Козовый Р.В. Анализ функционального состояния хроматина лимфоцитов периферической крови у долгожителей Прикарпатья / Р.В. Козовый // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 7 (2) – с. 324-327
5. Зерова-Любимова Т.Е., Горовенко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Методичні рекомендації. – Київ, 2003. – 24 с.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Губенко, П.Н. Бабич // 2-е изд., перераб. и доп. – К. : МОРІОН. – 2000. – 10408 с.
7. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях (Огляд літератури) / Ю.І. Губський, І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко [та інші] // Современные проблемы токсикологии. – 2004. – № 2. – С. 8-15.
8. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Переслягина // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21
9. Ran Q. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis / Q. Ran, H. Liang, Y. Ikeno [et al.] // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2007. – Vol. 62 (9) – P. 932–942.
10. Губський Ю.І. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях (Огляд літератури) / Ю.І. Губський, І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко [та інші] // Современные проблемы токсикологии. – 2004. – № 2. – С. 8-15.

11. Lewin's Genes XI. – 11th ed. / Jocelyn Krebs, Stephen Kilpatrick, Elio Goldstein., Jones and Bartlett Learning. – 2014. – 940 p.

Реферат

ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ДОЛГОЛЕТИЯ

Козовый Р. В., Ковальчук Л. Е.

Ключевые слова: корреляционный анализ, долгожители, глутатионовая система, окислительные модификации белков, структурно-функциональное состояние генома.

Обследовано 486 долгожителей (основная группа) и 297 человек в возрасте от 36 до 60 лет, в родословных которых не было долгожителей (группа сравнения). Проведен корреляционный анализ между биохимическими, цитогенетическими, морфометрическими и спектрометрическими параметрами исследуемых групп. Отобрано 29 количественных показателей активности состояния глутатионовой системы (ферменты глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы), окислительной модификации белков (ОМБ) в сыворотке крови, функционального состояния генома эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта, лимфоцитов, нейтрофилов. Анализ корреляций доказал важную роль ферментов эндогенной антиоксидантной глутатионовой системы в поддержании структурно-функциональной стабильности клеток и организма долгожителей. В основной группе установлены прямые очень сильные взаимосвязи между ОМБ основного и нейтрального характера, активностью ферментов глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и денситометрическими, цитогенетическими индексами; у людей группы сравнения выявлено более выраженное окислительное деструкцию белков, обуславливает большую частоту микроядер, хромосомных aberrаций, ядер с максимальной степенью компактизации хроматина, может быть одной из причин инкативации ферментов глутатионовой системы.

Summary

EVALUATION OF SIGNIFICANCE OF FACTORS DIFFERENT GENESIS INFLUENCING ON LIFE SPAN AND LONGEVITY

Kozovy R.V., Kovalchuk L. Ye.

Key words: correlation analysis, long-living persons, glutathione system, oxidative modification of proteins, structural and functional state of the genome.

486 long-living persons (test group) and 297 patients aged from 36 to 60 years who had no long-living blood relatives (control group) were subjected to comprehensive examination. The correlation analysis between biochemical, cytogenetic, morphometric and spectrometric parameters of the groups under the observation was carried out. We selected 29 quantitative indicators for determining the state of the glutathione system activity (enzymes glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase), oxidative modification of proteins (MBP) in serum, the functional state of the genome of epithelial cells of the oral mucosa, lymphocytes, neutrophils. The correlation analysis has proven the important role of enzymes of the endogenous antioxidant glutathione system in maintaining the structural and functional stability of the cells and the body of long-living persons. The test group established a very strong direct correlation between OMB of basic and neutral character, enzyme activity of glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and densitometric, cytogenetic indices; the persons of the control group demonstrated more pronounced oxidative degradation of proteins and a greater frequency of micronuclei, chromosomal aberrations, nuclei with a maximum degree of chromatin compaction, that might be one of the causes leading to inactivation of enzymes glutathione system.