

С.С.Ткачук

СТРЕС-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ В СТРУКТУРАХ МОЗКУ ЩУРІВ

Кафедра нормальної фізіології (зав. – д.м.н. О.Л.Кухарчук)
Буковинської державної медичної академії

Ключові слова: іммобілізаційний стрес, пренатальний стрес, окиснювальна модифікація білків, структури мозку.

Резюме. Досліджено вплив іммобілізаційного стресу на процеси окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у перегородці мозку, преоптичній ділянці, медіобазальному гіпоталамусі і мигдалеподібному комплексу мозку інтактних та пренатально стресованих самців щурів. Встановлено, що іммобілізаційний стрес активізує процеси ОМБ в досліджених структурах мозку тварин обох груп. Материнський стрес призводить до акумуляції ОМБ в структурах головного мозку.

Вступ. Однією з ранніх відповідей організму на дію стресових факторів є підсилення процесів біодеградації [3]. Завдяки значимості білків для життєдіяльності організму особливої уваги заслуговують механізми деградації білкових молекул та зміни в структурі білків, які є їх передумовою.

Важлива роль в обміні клітинних білків належить активним формам кисню, які модифікують їх і роблять більш чутливими до дії протеолітичних ферментів [10].

В біологічних системах будь-якого рівня організації постійно присутня деяка кількість активних форм кисню, що утворюються внаслідок функціонування електрон-транспортних ланцюгів мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму, ферментативних оксигеназних реакцій, які каталізуються циклооксигеназами, ліпоксигеназами, ксантиоксидазою та іншими ферментами [4].

Саме тому, навіть за ідеальних фізіологічних умов, постійно має місце окисдація білків, яка може підсилюватися дією несприятливих факторів.

Оскільки адаптаційні зміни в обміні білків тісно пов'язані з діяльністю генетичного апарату та епігенетичних механізмів, особливої увагу заслуговує вивчення дії несприятливих факторів в пренатальному періоді онтогенезу, коли організм особливо чутливий до їх впливу [6].

Материнський стрес підвищує ризик тератогенезу, викликає затримку фізичного розвитку та порушення різних форм нейроендокринної регуляції [6,8,9]. Немає сумнівів у тому, що значною мірою ці порушення зумовлені оксидативним пошкодженням білків [17].

Мета роботи. Дослідити стан ОМБ у пренатально стресованих самців щурів та її особливості в умовах дії стресорів.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на дорослих самцях безпородних білих щурів віком 90 діб, матері яких впродовж останнього триместру вагітності (з 15-ї по 21-у добу) підлягали дії одногодинного жорсткого іммобілізаційного стресу щоденно. Контрольні групи представлені самцями того ж віку, отриманими від інтактних самок.

Імобілізацію тварин проводили на спині, з фіксованими лапами, впродовж 2 годин.

Декапітацію щурів проводили під легким ефірним наркозом, мозок швидко виймали на холоді і одразу занурювали в рідкий азот. Робили зрізи, виділяли перегородку мозку (ПМ), преоптичну ділянку (ПД), медіобазальний гіпоталамус (МБГ), та мигдалеподібний комплекс (МК). Про ступінь ОМБ судили за кількістю 2,4-динітрофенілгідразонів, отриманих при взаємодії 2,4-динітрофенілгідразину з альдегідними і кетонними групами, утвореними в процесі ОМБ в радикалах залишків аліфатичних амінокислот.

Для дослідження використана модифікація методу [5], запропонованого для визначення ОМБ в плазмі крові.* Виділені структури мозку гомогенізували в охолодженому 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4). У центрифужні пробірки вносили 0,2 мл 2,5% гомогенату і 1,8 мл 5% трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували 10 хв за швидкості обертання 3000 об/хв. Ліпіди послідовно екстрагували 96° спиртом, сумішшю спирту з ефіром у співвідношенні 1:1, ефіром.

До отриманого осаду додавали 1 мл 1М 2,4-динітрофенілгідразину, розчиненого в 2М соляній кислоті і 1 мл 10% ТХО. У контрольні пробірки замість 2,4-динітрофенілгідразину вносили 1 мл 2М НСІ. Проби інкубували впродовж 1 год за температури 37°С, після чого центрифугували 10 хв за швидкості обертання 3000 об/хв. Одержаний осад тричі промивали 5% ТХО, після чого додавали 5 мл 8М розчину сечовини і витримували у кип'ячій водянній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на фотоелектроколориметрі КФК-3 за 370 і 430 нм проти контролю. Паралельно проводили визначення в пробах вмісту білка за методом [12].

На основі молярного коефіцієнта екстинції ($2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) знаходили вміст фенілгідразонів за 370 нм (альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру) в ммоль / г білка. Вміст альдегідо- і кетонпохідних основного характеру визначали при 430 нм і виражали в одиницях оптичної густини на 1 г білка.

Статистичну обробку результатів здійснювали за методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення . Базальні рівні альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру у інтактних тварин в межах досліджених структур суттєво не відрізнялися, за винятком преоптичної ділянки де їх вміст був вірогідно вищим (табл.1). Розподіл продуктів ОМБ основного характеру був рівномірним (табл.2).

Стресування інтактних тварин шляхом іммобілізації та внутрішньо-очеревинного введення 0,1% розчину етанолу призвело до загального збільшення кількості продуктів ОМБ в усіх структурах. Приріст альдегідо- і кетонпохідних нейтрального та основного характерів відповідно становив в ПМ – 131%, 207%, ПД – 79%, 163%, МБГ – 101%, 202%, МК – 115%, 186%.

При аналізі цих даних вимальовуються деякі особливості, а саме:

— значне переважання в усіх структурах приросту продуктів ОМБ основного характеру;

— нерівномірність зростання інтенсивності ОМБ в різних структурах;

* Висловлюємо щирю подяку завідувачу кафедри медичної хімії проф. І.Ф.Мешишену за надану можливість скористатися розробленою методикою та виконати дослідження в лабораторії

— відсутність чіткої залежності між базальними та стрес-індукованими рівнями продуктів ОМБ.

Що стосується першої особливості, вона узгоджується з даними літератури відносно різної чутливості амінокислот до активних форм кисню.

Експерименти, виконані з використанням пасток вільних радикалів і синглетного кисню, антиоксидантних ферментів, свідчать на користь участі різних форм кисню в процесах ОМБ, проте вважають, що безпосереднім модифікуючим агентом є гідроксильний радикал, до якого чутливі майже всі амінокислотні залишки. Однак за вразливості їх можна розташувати таким чином: гістидин (основна амінокислота) > цистеїн > триптофан > тирозин > інші [1,10].

Різницю стрес-індукованої інтенсивності ОМБ у вивчених структурах можна пояснити неоднаковою чутливістю відділів мозку до оксидативних пошкоджень, що зв'язано з різною кількістю іонів заліза в білках [7], локальними особливостями кровопостачання [2] та вмісту катехоламінаборбуючих протеїнів [14], відмінностями в кількості рецепторів глюкокортикоїдів [13].

На наш погляд, відсутність залежності стрес-індукованої інтенсивності ОМБ від базальної свідчить, що механізми її регуляції в стані функціонального спокою та за дії стресорів, принаймні частково, відрізняються.

Рівні продуктів ОМБ у пренатально стресованих тварин перевищували аналогічні рівні у контрольних на 126% та 146% в ПМ, 81% та 142% в ПОД, 92% та 129% в МБГ, 114% та 153% в МК для альдегідо- та кетонпохідних нейтрального і основного характеру відповідно, що свідчить про їх накопичення.

Акумуляція оксидативно модифікованих протеїнів може бути ранньою ознакою пошкодження тканин, опосередкованого активними формами кисню, а утворення білкових карбонільних дериватів асоціюється з патологічними станами організмів як людей, так і тварин [15,16]. У зв'язку з тим, що внутрішньоклітинний рівень окислювально модифікованих білків віддзеркалює баланс між темпом оксидації та темпом деградації окислених білків, їх накопичення є комплексною функцією численних факторів, котрі регулюють синтез та оксидацію протеїнів з одного боку, і активність різних протеаз, що селективно деградують окисдовані форми, з другого.

У різних клітинах накопичення модифікованих білків може відбуватися неоднаковими шляхами. На цей процес можуть впливати субстрати та кофактори, які захищають ензими від інактивації системою вільних радикалів, антиоксиданти, що пригнічують інактиваційні реакції [15]. Таким чином, виснаження субстратів і кофакторів, так само як і рівнів природних антиоксидантів, може робити білки більш чутливими до окиснювальної модифікації. Модифіковані протеїни набувають високої чутливості до дії протеаз, які в свою чергу проявляють селективність до цих білків [10,16]. Тому, якщо рівень внутрішньоклітинних протеаз за якихось причин зменшується, матиме місце акумуляція оксидативно модифікованих протеїнів.

Імобілізація пренатально стресованих тварин та введення етанолу призвели до зростання інтенсивності ОМБ (табл.1,2). Звертає на себе увагу велика різниця між приростом похідних нейтрального та основного характеру. Для перших приріст становив 70%, 43%, 40%, 58%, для других – 17%, 9%, 30%, 26% в ПМ, ПОД, МБГ та МК відповідно.

Вплив іммобілізаційного стресу на вміст альдегідо- і кетоноподібних нейтрального характеру в структурах мозку інтактних і пренатально стресованих шурів

№ серії	Умови досліджу	Кількість тварин	Вміст динітрофенілгидразонів, ммоль/г білка, 370 нм			
			Перегородка мозку	Преоптична ділянка	Медіобазальний гіпоаламус	Мигдалеподібний комплекс
1.	Інтактні	8	15,91 ± 0,41	19,34 ± 0,52	17,64 ± 1,19	15,74 ± 0,41
2.	Інтактні + етанол + іммобілізаційний стрес	8	36,81 ± 0,93 P ₁ < 0,0005	34,76 ± 0,65 P ₁ < 0,0005	35,44 ± 1,07 P ₁ < 0,0005	33,93 ± 0,89 P ₁ < 0,0005
3.	Пренатальний стрес	8	36,06 ± 1,06 P ₁ < 0,0005	34,99 ± 0,87 P ₁ < 0,0005	33,86 ± 0,91 P ₁ < 0,0005	33,65 ± 1,02 P ₁ < 0,0005
4.	Пренатальний стрес + етанол + іммобілізаційний стрес	8	61,32 ± 1,02 P ₃ < 0,0005	50,15 ± 1,04 P ₃ < 0,0005	47,35 ± 0,60 P ₃ < 0,0005	53,14 ± 0,53 P ₃ < 0,0005

Таблиця 2

Вплив іммобілізаційного стресу та мелатоніну на вміст альдегідо- і кетоноподібних основного характеру в структурах мозку інтактних і пренатально стресованих шурів

№ серії	Умови досліджу	Кількість тварин	Вміст динітрофенілгидразонів, о.о.г./г білка, 430 Нм			
			Перегородка мозку	Преоптична ділянка	Медіобазальний гіпоаламус	Мигдалеподібний комплекс
1.	Інтактні	8	271,39 ± 10,90	286,85 ± 14,40	260,74 ± 9,07	269,75 ± 8,58
2.	Інтактні + етанол + іммобілізаційний стрес	8	834,62 ± 6,51 P ₁ < 0,005	754,32 ± 14,41 P ₁ < 0,001	788,77 ± 17,34 P ₁ < 0,001	770,79 ± 15,91 P ₁ < 0,001
3.	Пренатальний стрес	8	667,71 ± 21,67 P ₁ < 0,0001	695,58 ± 27,14 P ₁ < 0,001	598,77 ± 12,74 P ₁ < 0,001	683,15 ± 11,51 P ₁ < 0,001
4.	Пренатальний стрес + етанол + іммобілізаційний стрес	8	780,49 ± 12,62 P ₃ < 0,00025	761,58 ± 17,42 P ₃ < 0,025	777,11 ± 22,03 P ₃ < 0,005	762,39 ± 16,27 P ₃ < 0,005

Примітка: о.о.г./г білка — одиниці оптичної густини на 1 г білка;

P₁ ... P₃ — вірогідність змін у порівнянні з відповідною серією. В решті випадків зміни невірогідні.

Якщо порівняти стрес-індукований приріст продуктів окисації в відповідних структурах мозку інтактних та пренатально стресованих щурів, то для похідних нейтрального характеру він майже не відрізняється, а приріст похідних основного характеру у щурів, які перенесли материнський стрес, значно нижчий. Це може свідчити про те, що у пренатально стресованих щурів накопичення ОМБ більшою мірою зумовлене порушенням механізмів деградації, ніж механізмів окисації.

Відомо, що серед білків найбільш вразливими до окисативних пошкоджень є ферменти, особливо ті, що містять іони металів [1, 15]. Дослідженнями лабораторії [16] показано, що декотрі з внутрішньоклітинних протеаз, які селективно деградують модифіковані білки, теж інактивуються реакційно-здатними формами кисню, що може бути причиною зменшення темпів деградації і призвести до накопичення в клітинах модифікованих білків, як це має місце в наших дослідах.

Висновки.

1. Імобілізаційний стрес активує ОМБ в структурах мозку інтактних та пренатально стресованих щурів.

2. Материнський стрес призводить до накопичення окисативно модифікованих білків в структурах головного мозку.

Література. 1. Арчаков А.И., Мохосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия.— 1989.— Т.54, вып. 2.— С.179-186. 2. Белова Т.И., Судаков К.В. Морфофункциональные изменения нейронов мозга в условиях эмоционального стресса // Вестн. АМН СССР.— 1990.— №2.— С. 11-13. 3. Блехман Г.И., Шеламова Н.А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи соврем.биол. — 1992.— Т.112, вып. 2.- С. 281-297. 4. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН.— 1998.— №7.— С. 43-51. 5. Мецишен І.Ф. Метод визначення окисловальної модифікації білків глази (сироватки) крові.— Бук.мед.вісник.— 1998.— Т.2, №1. — С. 156-158. 6. Резніков О.Г. Механізми розвитку: функціональної патології репродукції та адаптації в ранньому онтогенезі // Журн. АМН України.— 1998.— Т.4, №2.— С. 216-233. 7. Телушкин П.К. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов, активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ и протеаз в мозге крыс при многократном введении инсулина // Пробл.эндокринолог.— 1998.— Т.44, №4.— С. 35-38. 8. Яковлева Э.Б. Юные беременные, как группа риска акушерской и перинатальной патологии: Автореф.дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.01/ Киевский НИИ ПАГ.— К., 1991.— 35с. 9. Янюта С.М., Дашкевич В.Є., Тархасовський М.Л. Роль хронічного психоемоційного стресу у виникненні затримки розвитку плода // Педіатрія, акушерство і гінеколог.— 1997.— №5.— С. 65-68. 10. Davies K.J., Delsignore M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals // J.Biol.Chem.— 1987.— V.262, N20.— P.9908-9913. 11. Haghghi A.Z., Malpes K. On the mechanisms of the inhibition of glutamine-synthetase and creatine-phosphokinase by methionine sulfoxide // J.Neurosci.Res.—1996.— V.43, N1.— P. 107-111. 12. Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Parr A.L., Randall R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J.Biol.Chem.— 1951.— V.193, N1.— P. 265-275. 13. McIntosh L.J., Sapolsky R.M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin — induced toxicity in neuronal culture // Exp.Neurol.— 1996.— V.141, N2.— P.201-206. 14. Modi P.I., Kachyar A., Nair V.D. et al. Modulation of brain catecholamineabsorbing proteins by dopaminergic agents // Eur.J.Pharmacol.— 1996.— V.299, N1-3.— P. 213-220. 15. Oliver C.N., Ahn B., Moerman E. et al. Age-related changes in oxidized proteins // J.Biol.Chem.— 1987.— V. 262, N12.— P.548-549. 16. Stadtman E.R., Oliver C.N. Metal-catalyzed oxidation of protein // J.Biol.Chem.— 1991.— V. 266, N4.— P. 2005-2008. 17. Winn L.M., Wells P. Free radical-mediated mechanisms of anticonvulsant teratogenicity // Eur.J.Neurol.— 1995.— V.2, N4.— P. 5-29.

STRESS-INDUCED ALTERATIONS OF OXIDATIVE PROTEIN MODIFICATION IN THE RAT'S BRAIN STRUCTURES

S.S.Tkachuk

Abstract. We investigated the influence of immobilized stress on the processes of the oxidative protein modification (OPM) in the cerebral septum, preoptic area, mediobasal hypothalamus and amygdaloid cerebral complex of intact and prenatally stressed male rats. It was determined that immobilized stress activated the OPM processes in the investigated brain structures of the animal of both groups. Maternal stress resulted in an accumulation of OPM products in the brain structures.

Key words: immobilized stress, prenatal stress, oxidative protein modification, brain structures.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsy)