

СВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ОКСИДАТИВНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬЮ ПРОТЕОЛИЗА В БАЗАЛЬНЫХ ЯДРАХ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

Поступила 27.05.14

Исследовали связь между интенсивностью накопления оксидативно модифицированных белков и состоянием системы протеолиза в базальных ядрах (хвостатое ядро, бледный шар, прилежащее ядро перегородки, амигдаларный комплекс) мозга крыс после эпизода острой гипобарической гипоксии. Показано, что под действием острой гипоксии в базальных ядрах усиливаются процессы перекисидации белков параллельно с увеличением активности протеолиза. Аккумуляция окисленных протеинов рассматривается как один из факторов, влияющих на активность протеаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксидативно модифицированные белки, протеолиз, базальные ядра, острая гипоксия.

ВВЕДЕНИЕ

К существенным факторам, влияющим на развитие патологических состояний, следует отнести окислительную модификацию протеинов. Уровень таких протеинов в значительной мере связан, в частности, с активностью протеаз, которые «атакуют» такие белки гораздо легче, чем немодифицированные [1]. В нашем исследовании в опытах на крысах, подвергнутых острой гипобарической гипоксии, мы пытались выявить связь между содержанием оксидативно модифицированных белков (ОМБ) и активностью протеолиза в базальных ядрах – глубоких структурах головного мозга, которые имеют сложное морфологическое строение и полифункциональны. Как известно, ряд изменений в этих структурах ответственны за развитие разнообразных патологий.

МЕТОДИКА

Работа выполнялась на 32 крысах-самцах. Состояние гипобарической гипоксии у животных создавали в модифицированной барокамере, снижая давление до соответствующего высоте 12000 м над уровнем моря. В таких условиях крыс выдерживали

ли до второго агонального вдоха, после чего «опускали на нулевую высоту» [2]. Через 30 мин после прекращения действия острой гипоксии проводили декапитацию животных.

Для исследования извлекали ряд структур головного мозга – хвостатое ядро, бледный шар (паллидум), прилежащее ядро перегородки (аккумбенс) и амигдаларный комплекс (миндалину) [3]. Гомогенаты тканей этих структур готовили в трис-НСI-буфере (0.05 М, рН 7.4). Навески тканей получали путем объединения проб от двух животных.

Уровень ОМБ определяли согласно содержанию альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов. Этот показатель для ОМБ нейтрального характера измеряли, используя флуориметрию при длине волны 370 нм. Количество ОМБ основного характера устанавливали при длине волны 430 нм [4]. Интенсивность тканевого протеолиза определяли по показателям лизиса альбумина, казеина и коллагена [4]. Результаты исследования обрабатывали с помощью пакета программ «STATISTICA 5.0» с использованием дисперсионного анализа [5]; при этом в однофакторном анализе в качестве независимого фактора рассматривалась острая гипоксия. Для определения зависимости между измеренными показателями применяли корреляционный анализ с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции r Спирмена. Статистически достоверными считались межгрупповые различия при $P < 0.05$.

¹Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы (Украина).

Эл. почта: sopova.i.yu@gmail.com (И. Ю. Сопова).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под действием острой гипобарической гипоксии как концентрация продуктов белковой перекисидации, так и интенсивность протеолиза в базальных ядрах возрастали. Прирост альдегидо- и кетонпроизводных нейтрального характера в прилежащем ядре перегородки составлял в среднем 20.6 % ($F_{1,12} = 7.72, P = 0.017$), а в бледном шаре – 30.6 % ($F_{1,12} = 19.45, P = 0.0008$) (табл. 1). В этих же структурах происходило существенное накопление ОМБ основного характера. Соответственные показатели увеличивались на 28.5 ($F_{1,12} = 58.28, P = 0.000006$) и 48.2 ($F_{1,12} = 75.20, P = 0.000002$) %.

Параллельно в условиях острой гипоксии в базальных ядрах головного мозга увеличивалась протеолитическая активность (табл. 2). В наибольшей степени у животных, перенесших острую гипоксию, возрастала активность ферментов, расщепляющих коллаген. В прилежащем ядре перегородки такая активность увеличивалась в 1.7 ($F_{1,12} = 38.28, P = 0.00005$), в хвостатом ядре – в 1.6 ($F_{1,12} = 38.35,$

$P = 0.00005$), в амигдале – в 2.5 ($F_{1,12} = 207.80, P = 0$), а в паллидуме – в 5.1 ($F_{1,12} = 399.78, P = 0$) раза. Лизис альбумина и казеина после гипоксии возрастал также значительно, но лишь в отдельных ядрах. Так, альбуминрасщепляющая активность ферментов нервных клеток исследованных структур после действия гипоксии увеличивалась на 31.6–53.0 %. Показатели достоверности различий были следующими: в аккумуляне – $F_{1,12} = 17.82, P = 0.0012$, в бледном шаре – $F_{1,12} = 66.75, P = 0.000003$, в миндалине – $F_{1,12} = 38.05, P = 0.00005$. Увеличение активности ферментов, расщепляющих казеин, было обнаружено в прилежащем ядре перегородки (на 20.2 %; $F_{1,12} = 14.81, P = 0.0023$) и паллидуме (на 52.6 %; $F_{1,12} = 153.26, P = 0$).

Связь между накоплением окисленных протеинов в базальных ядрах в условиях тяжелой гипоксии и увеличением интенсивности протеолиза отчетливо отражалась в корреляционных связях. Устойчивые положительные корреляции выявлялись между показателями содержания ОМБ и активностью проте-

Т а б л и ц а 1. Содержание производных оксидативно модифицированных белков (ОМБ) в базальных ядрах мозга после эпизода острой гипоксии ($M \pm m, n = 6-8$)

Т а б л и ц я 1. Вміст похідних оксидативно модифікованих білків у базальних ядрах мозку після епізоду гострої гіпоксії ($M \pm m, n = 6-8$)

Определяемые продукты	Группы животных	Содержание, ммоль/г общего белка			
		прилежащее ядро	хвостатое ядро	бледный шар	миндалина
Альдегидо- и кетонпроизводные ОМБ нейтрального характера ($\lambda = 370$ нм)	контроль	7.8 ± 0.32	8.3 ± 0.30	7.4 ± 0.39	7.5 ± 0.30
	гипоксия	9.4 ± 0.48*	9.4 ± 0.52	9.7 ± 0.33*	7.9 ± 0.34
Альдегидо- и кетонпроизводные ОМБ основного характера ($\lambda = 430$ нм)	контроль	3.1 ± 0.08	3.6 ± 0.17	3.3 ± 0.10	3.1 ± 0.17
	гипоксия	4.0 ± 0.07*	3.9 ± 0.10	4.9 ± 0.15*	3.3 ± 0.07

Пр и м е ч а н и е. Звездочками отмечены случаи достоверных отличий от контроля с $P < 0.05$.

Т а б л и ц а 2. Интенсивность протеолиза в базальных ядрах мозга после эпизода острой гипоксии ($M \pm m, n = 6-8$)

Т а б л и ц я 2. Інтенсивність протеолізу в базальних ядрах мозку після епізоду гострої гіпоксії ($M \pm m, n = 6-8$)

Субстрат	Группы животных	Интенсивность протеолиза, $E_{440}/ч \cdot г$ ткани			
		прилежащее ядро	хвостатое ядро	бледный шар	миндалина
Альбумин	контроль	102.6 ± 6.23	106.5 ± 4.47	79.8 ± 3.26	55.1 ± 1.41
	гипоксия	135.3 ± 4.62*	92.5 ± 2.57*	122.1 ± 4.02*	72.5 ± 2.44*
Казеин	контроль	108.5 ± 3.81	78.0 ± 3.68	65.3 ± 1.14	50.7 ± 2.36
	гипоксия	130.4 ± 4.01*	88.0 ± 2.28	99.6 ± 4.93*	47.7 ± 1.58
Коллаген	контроль	2.9 ± 0.22	3.1 ± 0.12	1.8 ± 0.07	1.6 ± 0.08
	гипоксия	4.8 ± 0.22*	4.9 ± 0.27*	9.3 ± 0.76*	4.1 ± 0.24*

Пр и м е ч а н и е. Обозначения те же, что и в табл. 1.

олиза в прилежащем ядре перегородки (τ от 0.613 до 0.785) и бледном шаре (τ от 0.799 до 0.899).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показали, что тяжелая гипобарическая гипоксия сопровождается развитием окислительного стресса в базальных ядрах головного мозга. Увеличение содержания ОМБ после острой гипоксии, как правило, является следствием интенсификации продукции свободных радикалов [6, 7]. Возрастание интенсивности протеолиза, с одной стороны, может быть обусловлено действием того же фактора. Под действием острой гипоксии вследствие значительной активации свободнорадикальных процессов повреждаются клеточные мембраны, что сопровождается увеличением активности мембраносвязанных ферментов, к которым относятся и протеолитические [8]. С другой стороны, такое изменение активности протеолиза согласуется с предположением о том, что окислительная модификация белков служит одним из существенных механизмов регуляции их распада в клетке [9].

Эксперименты на животных были выполнены в соответствии с положениями Хельсинкской Декларации 1975 г., пересмотренной и дополненной в 2002 г. Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биоэтической этике Буковинского государственного университета. В ходе работ соблюдались принципы Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985).

І. Ю. Сопова¹

ЗВ'ЯЗОК МІЖ ВМІСТОМ ОКСИДАТИВНО МОДИФІКОВАНИХ БІЛКІВ ТА АКТИВНІСТЮ ПРОТЕОЛІЗУ В БАЗАЛЬНИХ ЯДРАХ МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ

¹Буковинський державний медичний університет, Чернівці (Україна).

Резюме

Досліджували зв'язок між інтенсивністю накопичення оксидативно модифікованих білків і станом системи протеолізу в базальних ядрах (хвостате ядро, бліда куля, прилегле ядро, амігдаларний комплекс) мозку щурів після епізоду гострої гіпобаричної гіпоксії. Показано, що під дією гострої гіпоксії в базальних ядрах посилюються процеси пероксидації білків паралельно зі збільшенням активності протеолізу. Акумуляція окиснених протеїнів розглядається як один із факторів, що впливають на активність протеаз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Е. Е. Дубинина, А. В. Пустыгина, "Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях", *Укр. біохім. журн.*, **80**, № 6, 5-18 (2008).
2. Л. В. Пастушенков, "Основные методы оценки протекторного действия антигипоксантов в эксперименте и особенности их влияния на обменные процессы в клетке", в кн.: *Фармакологическая коррекция гипоксических состояний*, Медицина, Москва (1989), с. 118-124.
3. Р. Д. Синельников, Я. Р. Синельников, *Атлас анатомии человека*, Медицина, Москва (1994).
4. В. М. Магальяс, А. О. Міхеєв, Ю. С. Роговий та ін., *Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень Центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії*, БДМА, Чернівці (2001).
5. О. В. Гойко, *Практичне використання пакета STATISTICA для аналізу медико-біологічних даних*, Вища шк., Київ (2004).
6. A. L. Dafre, N. S. Arteni, I. R. Siqueira, et al., "Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats," *Neurosci. Lett.*, **345**, No. 1, 65-68 (2003).
7. T. Zitnanova, K. Sumegova, and M. Simko, "Protein carbonyls as a biomarker of hypoxic stress," *Clin. Biochem.*, **40**, No. 8, 567-570 (2007).
8. К. Н. Веремеєнко, *Протеоліз в нормі і при патології*, Здоров'я, Київ (1998).
9. А. И. Араков, И. М. Мосохоев, "Модификация белков активным кислородом и их распад", *Биохимия*, **54**, № 2, 179-186 (1989).