



ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

Л.М. ОВСЕПЯН, Г.В. ЗАХАРЯН, Г.С. КАЗАРЯН

Институт молекулярной биологии, НАН РА

Целью настоящего исследования явилось определение уровня показателей перекисного окисления белков и липидов, а также активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы при гипоксии. Результаты исследований показали, что гипоксия сопровождается увеличением содержания перекисей липидов и белков в головном мозге и в мембранах эритроцитов при параллельном уменьшении активности супероксиддисмутазы.

Гипоксия – перекиси – липиды – белки – супероксиддисмутазы

Աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել սուր հիպոքսիայի ժամանակ ուսումնասիրել լիպիդների և սպիտակուցների գերօքսիդային պրոցեսները, ինչպես նաև հակաօքսիդատիվ ֆերմենտ սուպերօքսիդիզմուտազի ակտիվությունը: Ուսումնասիրության արդյունքները ցույց տվեցին, որ հիպոքսիան ուղեկցվում է գլխուղեղում և էրիթրոցիտների թաղանթներում լիպիդների և սպիտակուցների գերօքսիդների քանակի ավելացմամբ միաժամանակ սուպերօքսիդիզմուտազի ակտիվության նվազմամբ:

Հիպոքսիա (սպիտակուցներ (լիպիդներ (սուպերօքսիդիզմուտազ

The study was aimed at determining the level of proteins and lipids peroxidation and activity of antioxidant enzymes superoxiddismutase at hypoxia. The investigations have shown that content of lipoperoxidation products (proteins and lipids) increase in erythrocyte membranes and brain. Decreases the activity of SOD were registered as well.

Hipoxia - proteins - lipid – peroxide - superoxide dismutase

В настоящее время принято считать, что одним из факторов в развитии патологических состояний является оксидативный стресс. Его проявление выражается в сдвиге динамического равновесия в системе антиоксиданты – прооксиданты в сторону свободнорадикального окисления, продукты которого обладают широким спектром повреждающего действия. В литературе накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов перекисного окисления липидов и его роли в нормальном и патологическом функционировании клеток [7]. Активные формы кислорода (АФК) вызывают также перекисное окисление белков или, как еще называют, окислительную модификацию белков [3,15], в результате чего усугубляются мембранные повреждения. Считают, что в состоянии окислительного стресса атаке АФК, в первую очередь, подвергаются не липиды, а белки плазматических мембран [2,5]. Сведения, относящиеся к процессу свободнорадикального окисления белков, крайне малочисленны. Обсуждение возможной окислительной деструкции белков в организме до последнего времени носило в основном теоретический характер.

В ряде исследований этот процесс рассматривался как одна из возможных причин инактивации ферментов, изменения структурной организации белков при состоянии окислительного стресса [12,13]. В последнее десятилетие установлено, что процессы модификации белка являются начальной реакцией клетки на изменение условий ее функционирования. Одновременно с этим модификация белка служит сигналом для изменения метаболизма клетки. Фактически все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что приводит к изменению их функций [4]. Окислению подвергаются сульфо- и амингидроксильные группы аминокислот, что приводит к образованию поперечных сшивок между белками, или между белком и другой молекулой, содержащей NH_2 группу.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение состояния окислительной модификации белков и липидов в мембранах эритроцитов, в гомогенатах головного мозга, а также определение активности супероксиддисмутазы (СОД) при гипоксии.

Материал и методика. Опыты проводили на 20 беспородных белых крысах массой 170-200 г, содержащихся в условиях вивария. Острую гипоксию головного мозга создавали одновременной двусторонней перевязкой общих сонных артерий под эфирным наркозом (20 мин). Через 20 мин лигатуру снимали и через 50-60 мин животных декапитировали.

Мембраны эритроцитов выделяли осаждением с использованием буфера, состоящего из бикарбоната натрия, этилендиаминтетраацетата и хлористого натрия [9].

Уровень окислительной модификации белков в мембранах эритроцитов и в гомогенате головного мозга оценивали по содержанию карбонильных производных аминокислот в белках. Метод основан на том, что конечные продукты свободнорадикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Карбонильные производные после растворения белкового осадка в 8 М мочеvine при 37°C определяли при 363 нм, используя коэффициент молярной экстинкции $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ [8].

Содержание перекисей липидов определяли по реакции взаимодействия малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой, дающей цветное окрашивание, которое регистрировали при длине волны 535 нм [1].

Состояние антиоксидантного статуса оценивали по активности ключевого фермента антиоксидантной защиты организма СОД, которую определяли методом ингибирования супероксидрадикалов в реакции восстановления тетразолия нитросинего в присутствии НАДФН и феназинметасульфата [11].

Белок определяли по Лоури [10].

Результаты и обсуждение. Развитие любой патологии формирует определённый метаболический ответ организма, что приводит к изменению метаболического статуса, а его регистрация является важной и значимой, особенно при развитии патологических состояний

У животных с гипоксией исходный уровень ТБК-активных продуктов, карбонильных производных и активность супероксиддисмутазы в мембранах эритроцитов составили $6,8 \pm 0,45$; $5,38 \pm 0,32$; $12,15 \pm 0,68$ соответственно, что статистически значимо отличалось от показателей в группе интактных животных, где данные показатели составили $3,4 \pm 0,35$; $3,25 \pm 0,41$; $25,4 \pm 3,2$ соответственно. Это указывало на интенсификацию процессов СРО и снижение активности АОЗ у животных с гипоксией (табл. 1).

Особый интерес представляет исследование окислительной модификации белка в гомогенатах мозговой ткани в связи с повышенной чувствительностью последней к гипоксии, а также присутствием ионов железа и низкой антиокислительной активностью. В головном мозге животных с гипоксией нами обнаружено образование карбонильных производных, которые в присутствии 2,4-ДНФ-гидразинов образуют 2,4-динитрофенолгидразоны при длине волны 363 нм, что свидетельствует об окислительной деструкции белков при гипоксии.

Ведущая роль в поддержании антиоксидантного статуса принадлежит СОД, которая осуществляет антирадикальную защиту и ингибирует ПОЛ на стадии зарождения цепного процесса. Особенностью функционирования СОД является то обстоятельство, что в присутствии избыточного количества H_2O_2 она может образовывать высоко реакционноспособный гидроксильный радикал, который атакует белковые молекулы фермента, приводя их к потере активности [6]. Для эффективной работы СОД нуждается в присутствии каталазы, катализирующей превращение H_2O_2 в O_2 и H_2O .

Таблица 1. Показатели системы свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов и в гомогенатах головного мозга крыс при гипоксии (n=7)

	Мембрана эритроцитов		Головной мозг	
	Контроль	гипоксия	контроль	гипоксия
МДА, нмоль /мг белка	3,4 ±0,35	6,8±0,45 p<0,001	4,35± 0,33	8,68±0. 41 p<0,001
Карбонильные производные, ед.опт.пл./мг белка	3,25±0,41	5,38±0,32 p<0,01	5,05±0,22	6,83±0,3 p<0,001
СОД, у.е./мг белка	25,4± 3,2	12,15± 2,7 p<0,01	30,4± 3,0	13,56±2,17 p <0,001

Обнаруженная нами при гипоксии животных активация перекисного окисления белков и липидов сопровождается одновременным ингибированием СОД в эритроцитарных мембранах, а также СОД в гомогенате мозга. Изменение активности СОД при гипоксии имеет большое физиологическое значение, т.к. при недостатке кислорода формируются условия для усиления окислительного повреждения переносчиков дыхательной цепи [12] и тем самым создаются предпосылки для усиления генерации активных форм кислорода (супероксидрадикала, пероксида водорода).

Заслуживает внимания увеличение карбонильных производных в мозговой ткани животных с гипоксией, что указывает на активирование процесса перекисного окисления в белках. Наиболее распространенным пусковым механизмом окислительного повреждения мембранных белков является реакция сульфгидрильных (SH) групп аминокислоты цистеина со свободными радикалами. При этом образуются радикалы с локализацией неспаренного электрона около атома серы ($-S\cdot$), которые затем, взаимодействуя друг с другом, образуют дисульфиды, либо окисляются кислородом до производных сульфоновой кислоты.

Помимо цистеина, окислению подвергаются гистидин, серин, аргинин, метионин, фенилаланин, тирозин [14]. В мембранных белках под действием АФК возможно формирование комплексов “окисленный липид – белок”, полимеризация белковых молекул, разрушение боковых групп аминокислот (в первую очередь, содержащих SH-группы).

Результатом окисления аминокислот может быть нарушение вторичной и третичной структуры белков, облегчающее дальнейшее окисление аминокислотных остатков, и денатурация белковых молекул, в результате чего нарушаются их функции, в частности инактивируются ферменты. Нарушение структуры белков делает их доступными для протеолитических ферментов. К этому добавляется действие специфических протеаз, гидролизующих окисленные белки, для которых окисленные аминокислотные остатки являются маркерами [15].

Считают, что в основе образования комплексов белков с окисленными липидами лежат, по крайней мере, два механизма: (а) образование ковалентной связи между свободными SH-группами аминокислот и альдегидами или карбонильными группами окисленных липидов и (б) образование полимерных продуктов за счет формирования поперечных связей (“сшивок”) в белковых молекулах. Эти прочные нерастворимые поперечносшитые соединения не разрушаются ферментами лизосом.

Таким образом, повышенное образование продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов, а также уменьшение активности СОД являются причиной для нормального функционирования мембран клеток при гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.*, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах М, Наука, 252 с.,1972.
2. *Дубинина Е.Е.* Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток М., СПб: Медицинская пресса, 400с., 2006.
3. *Chakravarti B, Deb N.* Oxidative Modification of Proteins: Age-Related Changes, *Gerontology*, 53, p. 128-139, 2007.
4. *Dean R.T., Hunt J.V., Grant A.J. et al.* - Free radical damage to proteins: The influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins - *Free Rad. Biol. Med.*vol.11,p.161-165,1991.
5. *Ernst A., Stolz A., Sandig G et al.* Protein oxidation and the degradation of oxidized protein in the rat oligodendrocyte cell line OLN93-antioxidative effect of the intracellular spin trapping agent PBN *Brain Res Mol Brain*, 122, p.126-132. 2004.
6. *Fridovich I.* Fundamental aspects of reactive oxygen species ,or what's the matter with oxygen *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 893, p. 13-18, 1999.
7. *Halliwel B., Gutteridge J.* Free radical in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 210 p., 1999.
8. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 186, p. 464-478, 1990.
9. *Limber G.R., Davie R.F., Haker A.M.* Acrylamide gel electrophoresis studies of human erythrocyte membrane. *Blood*, 36, p.111-118, 1970.
10. *Lowry N.J., Rosenbogh, A.J., Farr et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 153, p. 256-275, 1951.
11. *Nishikimi N., Rao N.A., Iagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced PMS and molecular oxygen. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 46, p. 849–854, 1972.
12. *Richter C., Schwejzer M.* Oxidative stress in mitochondria N.Y, Acad Sci.,1997.
13. *Sayre L.M., Smith M.A., Perry G.* Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.*, 8, p.721-732, 2001.
14. *Stadtman ER, Levine RL* Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci.*, 899, 191–208, 2000.
15. *Thomas N.* Role of oxidative carbonylation in protein *The EMBO Journal*, 24, p. 1311–1317, 2005.

Поступила 07.04.2010.