



Биол. журн. Армении, 2 (64), 2012

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОМ СИНДРОМЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Л.М. ОВСЕПЯН, Г.С. КАЗАРЯН, М.В. ЛЬВОВ,
А.А. АКОПДЖАНИЯ

Институт молекулярной биологии, НАН РА
lhovsep@mail.ru

Исследовались окислительные процессы при экспериментальном синдроме болезни Паркинсона (БП). Обнаружено увеличение содержания гидроперекисей и малонового диальдегида при экспериментально вызванном синдроме БП. Анализ уровней окислительной модификации белков в ядерной и митохондриальной фракциях показал, что по сравнению с группой интактных животных статистически значимо увеличивается уровень алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов, что свидетельствует об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков при экспериментально вызванном синдроме БП.

*Перекиси липидов – окислительная модификация белка – синдром
болезни Паркинсона*

Ուսումնասիրվել են փորձարարական Պարկինսոնի սինդրոմի (ՊՍ) ժամանակ լիպիդների օքսիդային գործընթացները և սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիաների ցուցանիշները: Լիպիդների գերօքսիդների ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ հիդրոպերօքսիդների և մալոնային դիալդեհիդի քանակը ավելանում է փորձարարական ՊՍ-ի ժամանակ: Ավելանում է ալիֆատիկ-ալդեհիդ և կետոն-դինիտրոֆենիլհիդրազոնի մակարդակը: Նշված փաստը վկայում է սպիտակուցների օքսիդային պրոցեսների ակտիվացման ինտենսիվության մասին:

*Լիպիդների պերօքսիդներ – սպիտակուցի օքսիդային մոդիֆիկացիա –
Պարկինսոնի հիվանդության սինդրոմ*

The oxidative processes (peroxidation of lipids and proteins) at Parkinson's disease were studied. It was shown that the development of PD led to increase of hydroperoxides and malone dialdehyde in mitochondrial fraction of the brain. The levels of aliphatic aldehyde and ketone dinitrophenyl hydrazones were also increased that suggested the acceleration of oxidative destruction of proteins. It was concluded that the oxidative modification of lipids and proteins occurs at PD and, probably, plays an essential role in pathogenesis and development of this disease.

Lipid – peroxide – oxidative modification protein – Parkinson's disease

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, проявляющееся двигательными, психическими и вегетативными расстройствами. Прогрессирующее течение, недостаточная эффективность терапии, тяжелая инвалидизация, наступающая у большинства больных, превращают БП в серьезную социальную проблему.

В основе двигательных нарушений при БП-тремора, ригидности, олигокинезии лежит первичное поражение дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции, что приводит к снижению уровня дофамина (ДА) в стриатуме [4]. Несмотря на многочисленные исследования, первичные причины гибели ДА нейронов при БП остаются невыясненными. Из литературных данных известно, что при данном нейродегенеративном заболевании поражение дофаминергических нейронов черной субстанции и связанное с ним нарушение метаболизма дофамина, всегда сопровождается активацией свободно-радикальных процессов, а тяжесть клинических проявлений достоверно коррелирует с изменением показателей равновесия между про- и антиоксидантными системами [8,13].

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование интенсивности окислительной деструкции белков и липидов в митохондриальной фракции головного мозга у животных с экспериментально вызванным синдромом болезни Паркинсона.

Материал и методика. Эксперименты проводили на беспородных белых старых крысах (возраст 2-2,5 года), содержащихся в условиях вивария. Модель экспериментального синдрома БП осуществляли ежедневным внутрибрюшинным введением МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрапиридин) в дозе 25,0 мг/кг в течение 7 дней.

Животные были распределены на 2 группы, в каждой по 10 животных: 1 – интактные; 2 – животные с воспроизведенным синдромом БП. Регистрировали поведенческие характеристики (координацию движений, качание головы, ригидность мышц передних и задних лап, нарушение походки, слюнотечение), которые служили критерием развития болезни.

Ядерную и митохондриальную фракции головного мозга выделяли в среде, содержащей 0,25М сахарозы и 0,01 М трис-НС1 буфера, pH-7,4, методом дифференциального центрифугирования (ядра при 600g, митохондрии – 13000 g) [5].

Об активности ПОЛ судили по количеству образования гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА). ГП определяли по цветной реакции с тиоционатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [6]. МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [6].

Для количественного определения продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) был применен метод, основанный на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков и 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, количество которых определяли спектрофотометрически. Оптическую плотность образовавшихся карбонильных производных динитрофенилгидразонов регистрировали при различных длинах волн: 356 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера; 370 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера; 430 нм – алифатические КДНФГ основного характера; 530 нм – алифатические АДНФГ основного характера. [9,2]. Белок определяли по Лоури [10].

Результаты и обсуждение. Перекисное окисление изучалось нами в ферментативной (НАДФ-Н-зависимой) и неферментативной (аскорбат-зависимой) системах окисления. Ферментативная НАДФ-Н зависимая система перекисного окисления использует в качестве донора редуцирующих эквивалентов восстановленный НАДФН. Неферментативная аскорбат-зависимая система перекисного окисления использует в качестве восстановителя аскорбиновую кислоту. Изучение процесса

перекисного окисления липидов в субклеточных фракциях головного мозга позволило обнаружить увеличение содержания гидроперекисей и малонового диальдегида при экспериментально вызванном синдроме БП (табл.1). Содержание МДА в ядерной фракции интактных крыс при аскорбат- и НАДФН-зависимом перекислении составило $5,66 \pm 0,56$ и $4,21 \pm 0,3$ соответственно.

Таблица 1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ядерной фракции (в аскорбат- и НАДФН- зависимой системе окисления липидов) в норме и при экспериментальном синдроме БП (n=7)

Показатели	Аскорбат-зависимое перекисление		НАДФН-зависимое перекисление	
	контроль	синдром БП	контроль	синдром БП
Гидроперекиси Σ /мг белка	$0,58 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,049^*$	$0,48 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,04^*$
МДА/мг белка	$5,66 \pm 0,56$	$9,73 \pm 0,77^{**}$	$4,21 \pm 0,3$	$8,68 \pm 0,4^*$

Примечание: * - $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в митохондриальной фракции (в аскорбат- и НАДФН-зависимой системе окисления липидов) в норме и при экспериментальном синдроме БП (n=7)

Показатели	Аскорбат-зависимое перекисление		НАДФН-зависимое перекисление	
	контроль	синдром БП	контроль	синдром БП
Гидроперекиси Σ /мг белка	$0,78 \pm 0,06$	$1,3 \pm 0,1^{**}$	$0,55 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,03^*$
МДА/мг белка	$7,32 \pm 0,02$	$12,87 \pm 1,28^{**}$	$5,8 \pm 1,2$	$10,3 \pm 1,4^*$

Особый интерес вызывает исследование процессов перекисления в митохондриальной фракции. Как вытекает из фактического материала, течение реакций перекисления липидов до гидроперекисей более интенсивно протекает в митохондриальной фракции, чем в ядерной. Аналогичная закономерность прослеживается и в интенсивности образования малонового диальдегида. При синдроме БП исходный уровень ТБК-активных продуктов в митохондриальной фракции составил в случае аскорбат-зависимого перекисления $12,87 \pm 1,28$, а в случае НАДФН-зависимого $10,3 \pm 0,4$ нмоль/мг белка, что статистически значимо отличалось от показателей в группе интактных крыс, где данные показатели составили $7,32 \pm 0,02$ и $5,8 \pm 0,2$ нмоль/мг белка. Это указывает на интенсификацию процессов СРО в субклеточных фракциях.

Гидроперекиси и малоновый диальдегид являются продуктами окислительного распада полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой) – важнейшими компонентами фосфолипидов биологических мембран.

В молекулах жирных кислот, особенно арахидоновой кислоты, имеется наибольшее количество двойных связей, поэтому они легче подвергаются свободнорадикальному окислению. Отрыв атома водорода от молекулы полиненасыщенных жирных кислот под воздействием активных форм кислорода легче всего происходит в α -положении по отношению к двойной связи. В результате окисления жирных кислот образуются гидроперекиси, которые затем метаболизируются во вторичные – малоновый диальдегид и третичные продукты перекисного окисления липидов. Уровень продуктов перекисного окисления зависит от количества антиоксидантов в клетке. Из литературных данных известно, что при БП в черной субстанции, в противоположность другим отделам мозга, снижено число глиальных клеток, содержащих естественный антиоксидант - глутатион пероксидазу, а также отмечен низкий уровень глутатиона [1,12]. Низкий уровень антиоксидантов сопровождается высоким уровнем активных форм кислорода, об

ладающих цитотоксичными свойствами ингибировать сульфгидрильные группы ферментов и повреждать NH₂- группы мембранных белков.

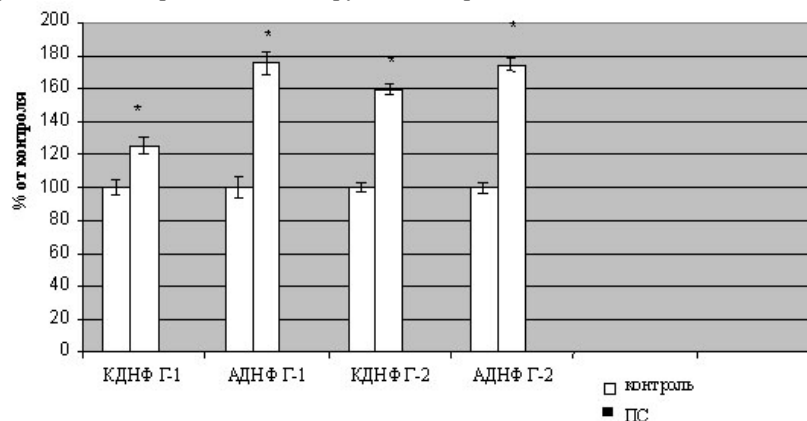
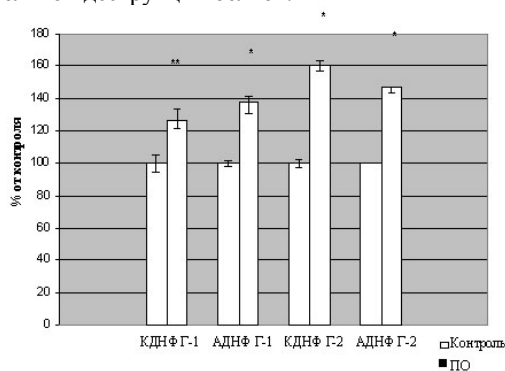


Рис.1. Окислительная модификация белков в ядерной фракции в норме и при БП(n=7)
1-нейтрального характера, 2-основного характера
*-p>0,01

Исходя из этого, мы провели исследование по определению содержания окислительного повреждения белков при моделировании синдрома БП.

На рис. 1,2 даны продукты окисления белков, которые прореагировали с 2,4-динитрофенилгидразином в ядерной (рис. 1), митохондриальной фракциях (рис. 2). На этих рис. представлен процент разницы от контроля образовавшихся 2,4-динитрофенолгидразонов. Анализ уровней окислительной модификации белков во фракциях головного мозга крыс с экспериментальным синдромом БП показал, что по сравнению с группой интактных животных (показатели которых мы приняли за 100%) статистически значимо увеличивается уровень алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длинах волн 356, 370, 430, 530 нм. Данный факт свидетельствует об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков.



Длина волн - 356нм 370нм 430нм 530нм
1-нейтрального характера, 2-основного характера
*-p>0,01

Рис.2. Окислительная модификация белков в митохондриальной фракции в норме и при синдроме БП (n=7).

Из литературных данных [2] известно, что окислительная модификация рассматривается как один из ранних маркеров окислительного стресса. Интенсивность окислительной модификации белков определяется в первую очередь особенностями аминокислотного состава белка. Акцепторными группами, которые способны перехватывать электроны, взаимодействуя с активными формами кислорода и образовывать анион-радикалы, могут служить дисульфидные, сульфгидрильные, карбонильные и карбоксильные и NH- группы белков [3]. Механизмы накопления таких белков могут быть различны. Например, формирование окисленных белков является типичным результатом влияния активных форм кислорода, которые образуются в результате многих метаболических процессов клетки и часто препятствуют нормальной работе белка.

Окислительное повреждение белков играет важную роль в этиологии болезней Паркинсона и Альцгеймера [11]. Считают, что накопление повреждённых белков происходит с возрастом и может отвечать за такие ассоциированные с возрастом болезни как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и катаракта [7].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что окислительная модификация белков и липидов играет существенную роль в патогенезе развития синдрома болезни Паркинсона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуляева Н.Б., Ерин А.Х. Роль свободнорадикальных процессов в развитии нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона и Альцгеймера). *Нейрохимия*. 2, с. 3-15, 1995.
2. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В., и др. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами. *Вопросы мед. химии*, 4, с.1-14, 2000.
3. Каюшин Л.П., Пулатова М.К., Кривенко Б.Г. Свободные радикалы и их превращения в облученных белках, М., Атомиздат, 269, 1976.
4. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. и др. Болезнь Паркинсона. М., 2002.
5. Прохорова М.И. (под ред.) Методы биохимических исследований. Л., 1982.
6. Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича, М., Медицина, 1977.
7. Chakravarti B, Deb N., Oxidative Modification of Proteins: Age-Related Changes, *Gerontology*, 53, p.128-139, 2007.
8. Jenner P., Olanow S.W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology*, 66, p. 24-36, 2006.
9. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins - Meth. *Enzymol.*, 186, p.464- 478, 1990.
10. Lowry N.J., Rosenbogh A.J., Farr A., L. Protein measurement with folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.* 193, p.265-275, 1951.
11. Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 443, p. 780-786, 2006.
12. Thiruchelvam M., Prokopenko O., Cory-Slechta D.A., Richfield E.K., Buckley B., Mirochnitchenko O. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. *J. Biol Chem.*, 280, 23, p. 22530-22539, 2005.
13. Tsang A.H., Chung K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 7, p. 643-50, 2009.

Поступила 23.12.2011