

УДК 577.15:612.391

©Б.Ф. Керимов

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ В РАЗНЫХ ОТДЕЛАХ МОЗГА НОРМАЛЬНЫХ И ГОЛОДАВШИХ ЖИВОТНЫХ

Б.Ф. Керимов

Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджанской Республики,
370100 Баку, ул. Шариф-заде, 2; эл. почта: inphys@dcacs.ab.az

Изучена активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a (ГТ- Y_aY_a) и Y_bY_b (ГТ- Y_bY_b) в цитоплазматической фракции подкорковых (гипоталамус, продолговатый и средний мозг) и корковых структур мозга (лимбическая, орбитальная и сенсомоторная кора) в норме и при различных сроках голодания (1, 2, 3, 5 и 7 суток).

Установлено, что во всех исследованных отделах мозга активность ГТ- Y_bY_b почти в 2 раза превышает ГТ- Y_aY_a активность. Базальный уровень активности обеих форм глутатион-S-трансферазы в корковых образованиях приблизительно также в 2 раза больше, чем в стволовых структурах.

Существенное увеличение активности ГТ- Y_aY_a и ГТ- Y_bY_b как в корковых, так и подкорковых структурах имело место при 3-х и особенно 5-ти суточном голодании, причем в раннем периоде голодания активировалась ГТ- Y_aY_a , а в позднем периоде ГТ- Y_bY_b .

Ключевые слова: голодание, глутатион-S-трансфераза Y_a и Y_a , Y_bY_b , гипоталамус, кора и ствол мозга.

ВВЕДЕНИЕ. Голодание и насыщение представляют собой ярко выраженное внутреннее эмоциональное состояние организма, которое играет важную роль в пищевой деятельности человека и животных. Состояние голодания характеризуется перестраиванием метаболизма и переключением режима работы нейрогуморальных и метаболических регуляторных систем энергетического и пластического процессов к эндогенному типу питания [1]. В ходе этих процессов изменяется содержание биогенных аминов [2], жирно- и водорастворимых антиоксидантов [3], некоторых гормонов и простагландинов [4]. В результате нарушения регуляции метаболических процессов, а также стимуляции перекисного окисления липидов, в тканях организма накапливаются недоокисленные цитотоксические вещества, гидроперекисные и перекисные соединения [5], а также другие нейротоксины, которые вызывают структурные и функциональные изменения клеточных компонентов нервных клеток [6].

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют, что в обезвреживании и детоксикации как экзогенных, так и эндогенных цитотоксинов существенная роль принадлежит глутатион-S-трансферазным ферментным системам [7]. Они представляют собой семейство мультифункциональных белков, которые функционируют как в качестве детоксикационных ферментов, так и внутриклеточных связывающих белков [8]. Множественные формы глутатион-S-трансферазы защищают организм от огромного количества ксенобиотиков или их микросомальных метаболитов путем биотрансформации, нековалентного связывания и ковалентного присоединения [9].

ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА МОЗГА ПРИ ГОЛОДАНИИ

Существует около 11 форм глутатион-S-трансфераз в тканях организма, представляющих собой комбинацию субъединиц, идентифицированных как $Y_aY_bY_c$ [10], а в головном мозге более активно функционируют два типа глутатион-S-трансфераз, а именно Y_aY_a (катализирующая превращение гидроперекисей жирных кислот и ДНК в нормальные оксисоединения) и Y_bY_b (конъюгация ароматических соединений).

Учитывая, что при голодании в нервных тканях накапливаются различные по химической природе эндогенные цитотоксические вещества, целью настоящего исследования явилось изучение активности наиболее активных глутатион-S-трансфераз- Y_aY_a и Y_bY_b в корковых и подкорковых отделах мозга как у интактных животных, так и при различных сроках голодания.

МЕТОДИКА. Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 170 - 210 г. Животные были разделены на 6 групп (по 8 животных в каждой).

I группа - контрольные животные, которые находились на свободном пищевом и питьевом режимах. Животные II, III, IV, V и VI групп голодали соответственно 1, 2, 3, 5 и 7 суток при обычном питьевом режиме. После декапитации контрольных и опытных крыс головной мозг быстро извлекали на холоду (4°C) и отмывали от крови раствором 0,1 М трис-HCl буфера pH 7,5 (охлажденного до 4°C), содержащего 5 мМ ЭДТА-Na₂, а затем просушивали фильтровальной бумагой. Исследованию подвергались продолговатый, средний мозг, гипоталамус, лимбическая, орбитальная и сенсомоторная области коры, границы которых выявили в соответствии с атласом Светухина [11]. Гомогенаты тканей готовили в 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,5) в соотношении 1 : 9 (масса/объем), используя гомогенизатор РТ-2 с тефлоновым пестиком на холоду. Цитозольную фракцию, содержащую примеси микросом, получали путем центрифугирования 10 %-ного гомогената при 20.000 g в течение 60 мин. при 40С. Осадок дважды промывали и в объединенной цитозольной фракции определяли активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a [12] с использованием гидроперекиси арахидоновой кислоты в качестве субстрата и глутатион-S-трансферазы Y_bY_b [13] с использованием 1-хлор-2,4-динитробензола в качестве субстрата. Активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a выражали в нмоль израсходованного GSH в 1 мин на 1 мг белка, а глутатион-S-трансферазы - по образованию конъюгированного продукта, который пропорционален израсходованному GSH в течение 1 мин на 1 мг белка. Содержание глутатиона определяли спектрофотометрическим методом [14], используя 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту), а белка - по методу Lowry и соавт. [15]. Полученные данные подвергали статистической обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты проведенных исследований (табл. 1 и 2) показывают, что как в корковых, так и в подкорковых отделах мозга активность глутатион-S-трансферазы Y_bY_b почти в 2 раза выше, чем активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a . При сравнении активностей этих ферментов в разных отделах мозга выявляется, что в корковых образованиях глутатион-S-трансферазная активность также в 2 раза превышает таковую в стволовых структурах. В гипоталамусе глутатион-S-трансферазная активность выше, чем в стволовых структурах и ниже, чем в корковых образованиях. Необходимо отметить, что в разных отделах коры головного мозга содержание и активность обеих форм этого фермента представлены приблизительно одинаково.

В исследованных структурах мозга нами была установлена аналогичная закономерность распределения содержания восстановленного глутатиона [16] и активности глутатионпероксидазы [17]. По существу, это означает, что в коре как антиоксидантная, так и антипероксидная активность выше, чем в эволюционно более древних образованиях мозга. Более активное функционирование системы генерации свободных радикалов и перекисных соединений подразумевает наличие мощных антиоксидантных механизмов, что имеет место в корковых образованиях как у нормальных животных, так и при воздействии на организм различных экстремальных факторов [18]. При различных сроках голодания в изученных

Таблица 1. Активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a (GSH, нмоль/мин на 1мг белка) в корковых и подкорковых структурах мозга нормальных животных и при различных сроках голодания.

Исследуемые структуры	Контроль	Дни голодания				
		1	2	3	5	7
Продолговатый мозг	16,1±1,32	17,4±1,26	18,2±1,12	21,6±1,41*	23,6±1,37**	20,7±1,28*
Средний мозг	18,3±1,26	17,6±1,11	19,4±1,33	26,2±1,72**	27,1±2,11**	23,8±1,43*
Гипоталамус	31,4±2,28	30,7±1,92	42,5±3,02*	43,7±3,12**	48,5±2,86***	52,6±3,37***
Лимбическая кора	33,2±1,94	34,1±2,11	50,7±3,21***	52,3±3,45***	53,6±3,85***	45,8±3,13**
Сенсомоторная кора	34,6±2,91	35,3±2,64	56,5±4,03**	55,1±3,63***	58,1±4,13***	51,8±3,21**
Орбитальная кора	38,4±2,64	38,1±3,15	61,8±4,64***	63,2±3,73***	60,8±4,37***	54,8±3,17**

Примечание: В табл. 1 и 2 звездочки - достоверность различий по отношению к контролю: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, Представлены средние значения (\pm ошибка средней) 6-7 экспериментов

Таблица 2. Активность глутатион-S-трансферазы Y_bY_b (нмоль конъюгированного продукта в 1 мин. на 1 мг белка) в корковых и подкорковых структурах мозга у нормальных и голодавших животных.

Исследуемые структуры	Контроль	Дни голодания				
		1	2	3	5	7
Продолговатый мозг	34,2±2,41	33,7±3,25	35,8±2,15	48,8±3,32**	47,1±3,24**	49,5±3,22**
Средний мозг	38,6±2,36	39,4±3,37	39,7±2,46	56,8±3,81**	53,3±2,91**	55,1±3,47**
Гипоталамус	41,3±3,46	40,8±3,78	55,6±2,84**	66,6±4,34***	75,3±5,16***	72,8±4,23***
Лимбическая кора	74,4±5,23	75,2±6,18	78,3±5,71	119±7,77***	138±7,92***	120±7,23***
Сенсомоторная кора	73,1±4,64	72,8±6,93	75,7±5,81	111±7,24**	141±8,71***	123±7,94***
Орбитальная кора	71,3±5,12	71,7±5,81	74,2±4,85	105±6,81**	134±8,14***	116±8,23***

отделах мозга активность разных форм глутатион-S-трансферазы подвергается существенным изменениям. На основании морфологических, поведенческих и биохимических изменений нами предпринята попытка выделить два периода голодания. Первый период, охарактеризованный как кратковременное голодание, включает в себя голодание животных до 3-х суток, а второй период, охарактеризованный как длительное голодание, развивается у животных после 5-ти суточного голодания. Необходимо отметить, что в зимнем периоде крысы линии Вистар выдерживают 7 - 8 дней полного голодания при свободном доступе к воде. Результаты проведенных исследований показывают, что (табл. 1 и 2) голодание в течение 24ч не сопровождалось изменением активности обеих форм глутатион-S-трансферазы как в корковых, так и подкорковых образованиях мозга. При голодании в течение двух суток имело место повышение активности только глутатиона-S-трансферазы Y_aY_a в гипоталамусе (на 35,5 %, $p<0,01$) и корковых образованиях, особенно ярко выраженное в сенсомоторной коре (на 63,4 %, $p<0,001$). При голодании в течение трёх суток во всех исследованных структурах отмечено повышение активности глутатион-S-трансферазы Y_aY_a и Y_bY_b , которое было зарегистрировано при 5 и 7 суточном голодании. Однако, в различных структурах мозга повышение глутатион-S-трансферазной активности происходило неодинаково. Особенно выраженное увеличение активности ферментов наблюдалось в корковых образованиях мозга. Так, например, на 5-й день голодания в сенсомоторной коре активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a и Y_bY_b увеличивается соответственно на 68 % ($p<0,001$) и 93 % ($p<0,001$), в то время как в продолговатом мозге активность этих ферментов повышается на 46,6 % ($p<0,01$) и 37,7 % ($p<0,01$) соответственно.

ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА МОЗГА ПРИ ГОЛОДАНИИ

В целом, изложенное позволяет предположить, что разные отделы головного мозга крысы обладают достаточно высокой глутатион-S-трансферазной активностью, которая, очевидно, способствует обезвреживанию наиболее токсичных эндогенных соединений, образующихся как в ходе нормального течения метаболических процессов [6, 18], так и при воздействии на организм экстремальных факторов [19]. Установлено, что при голодании в тканях организма, а также в нервных образованиях активируется перекисное окисление липидов мембран клеточных и субклеточных органелл с накоплением в излишнем количестве различных перекисных и гидроперекисных соединений [5, 6]. Кроме того, фазное изменение содержания биогенных аминов при различных сроках голодания сопровождается активацией моноаминоксидазы. Этот фермент катализирует превращение биогенных аминов с образованием наиболее токсичных аминокальдегидных соединений и H_2O_2 [20]. Можно предположить, что в результате нарушения регуляции метаболических процессов в нервных тканях накапливаются эндогенные цитотоксические вещества, которые являются субстратами различных форм глутатион-S-трансфераз и детоксицируются с использованием восстановленного глутатиона. Учитывая то, что глутатион-S-трансфераза Y_aY_a участвует в механизме детоксикации гидроперекисных соединений липидов и ДНК, можно думать о том, что этот фермент и глутатионпероксидаза обладают перекрывающейся субстратной специфичностью, что может иметь важное значение в механизме защиты структурных и функциональных компонентов нервных клеток от повреждающих факторов окислительного характера. Локализованная в головном мозге еще более активная форма глутатион-S-трансферазы Y_bY_b участвует в обезвреживании ксенобиотиков. При кратковременном голодании в нервных тканях скорость образования эндогенных цитотоксических веществ меньше, чем при длительном голодании и по этой причине значительное снижение содержания поверхностно расположенных и структурно-замаскированных белковых SH-групп имело место только при 5-и и 7-суточном голодании [21]. Этот процесс более интенсивно протекает в гипоталамусе и различных корковых образованиях, что свидетельствует об их значительной роли в формировании пищевого мотивационного поведения.

Таким образом, можно полагать, что глутатион-зависимый метаболически адаптационный процесс вовлечен в механизм поддержания структурной и функциональной целостности нейрональных и глиальных компонентов как у нормальных животных, так и при голодании. В пользу этого положения также свидетельствует высокая концентрация восстановленного глутатиона в коре мозга, как эволюционно новом образовании мозга наиболее богатым компонентами глутатионовой защитной системы и который в первую очередь реагирует на изменение окислительно-восстановительного процесса и в наибольшей степени подвергается повреждению.

Сохранение повышенной активности обеих форм глутатион-S-трансферазы при длительном голодании вероятно связано с наличием разнообразных по химическому строению субстратов и восстановленного глутатиона.

Необходимо отметить, что эти ферменты обладают строгой субстратной специфичностью только по отношению к глутатиону и поэтому регенерация глутатиона является лимитирующим фактором в активности этих ферментов.

ВЫВОДЫ: 1. Корковые и подкорковые образования мозга обладают достаточно высокой глутатион-S-трансферазной активностью, особенно двух форм Y_aY_a и Y_bY_b .

2. В корковых образованиях активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a и Y_bY_b почти в 2 раза выше, чем в стволовых образованиях.

3. Как в корковых, так и подкорковых отделах активность глутатион-S-трансферазы Y_bY_b приблизительно в 2 раза больше, чем активность глутатион-S-трансферазы Y_aY_a .

4. В корковых и подкорковых отделах мозга значительная активация обеих форм глутатион-S-трансферазы выявлена при длительном голодании, что свидетельствует об усилении антитоксической функции нервных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Norwin D., Wyrwika-Bray G.A. (1976) Hunger: Basic mechanisms and clinical implications, New-York, Raven Press.
2. Кравец С.В. (1985) Физиол. журн. **31**, 468-472.
3. Smith L.J., Horcher P., Anderson J., Shamsudelin M. (1990) J. Lab. and Clin. Med., **116**, 717-723.
4. Garrity N.J., Brass E.P. (1987) Endocrinology, **120**, 1134-1139.
5. Эфендиев Ф.М., Керимов Б.Ф. (1994) Вопр. мед. химии, **40**, 34-37.
6. Halliwell B., Gutteridge M.C. (1985) Trend. Neurosci., **8**, 22-26.
7. Boyer T.D. (1989), Hepatology, **9**, 486-496.
8. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. (1989) Усп. соврем. биол., **107**, 179-194.
9. Jakoby W.B. (1978) Adv. Enzymol., **46**, 383-415.
10. Jakoby W.B., Ketterer B., Mannervik B. (1984) Biochem. Pharmacol., **33**, 2539-2540.
11. Светухина В.М. (1962). Архив. анат. гистол. и эмбриол., **52**, 2-6.
12. Douglas K.T. (1987) Adv. Enzymol., **59**, 103-168.
13. Habeb H.S. (1984) J. Lab. Clin. and Med., **156**, 165-174.
14. Ellman G.L. (1959) Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 70-77.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
16. Аскеров Ф.Б., Керимов Б.Ф., Алиев С.А. (1987) Изв. АН Азерб. ССР, **3**, 116-120.
17. Керимов Б.Ф., Алиев С.А. (1991) Укр. биохим. журн., **63**, 63-67.
18. Sies H. (1999) Free Rad. Biol. Med., **27**, 916-922.
19. Aykac G. (1986) Drug. Alcohol. Depend., **18**, 73-75.
20. Sandri G., Panfili E., Ernster L. (1990) Biochim. Biophys. Acta., **1035**, 300-305.
21. Аскеров Ф.Б., Керимов Б.Ф., Алиев С.А., Гасанов М.А. (1988) Изв. АН Азерб. ССР, сер. биол. наук., 93-98.

Поступил 25.09.01

GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVITIES IN VARIOUS BRAIN AREAS IN NORMAL AND STARVED ANIMALS

B.F. Kerimov

Karaev Institute of Physiology,
Natl. Acad. Sci. of Azerbaijan Republic,
Sharif-zade st., 2, 370100 Baku, e-mail: inphys@deacs.ab.az

Glutathione-S-transferase Y_aY_a (GT- Y_aY_a) and Y_bY_b (GT- Y_bY_b) activities were studied in cytosolic fraction of the cortical (limbic, orbital and sensorimotor cortex) and subcortical (myelencephalon, mesencephalon, hypothalamus) structures of rat brain under different terms of starvation (1, 2, 3, 5 and 7 days). In all brain structures GT- Y_bY_b activities were approximately 2 times higher than those of the GT- Y_aY_a activities. Basal activity of both forms of glutathione-S-transferase in cortical structures was also 2 times higher than that in the stem structures. Significant increase of activities of the GT- Y_aY_a and GT- Y_bY_b was selected both in cortical and subcortical structures on the third day and especially on the fifth day of starvation.

It was concluded, different rat brain structures possess high glutathione-S-transferase activities, which are activated after long term starvation.

Key words: starvation, glutathione-S-transferase and, hypothalamus, brain cortex and stem.