

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.В. Вьюшина, А.В. Притворова, О.Г. Семенова, Н.Э. Ордян*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; *эл. почта: PritvorovaAV@infran.ru

Определена активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях (цитозольной, митохондриальной и ядерной) печени взрослых крыс самцов линии Wistar, родившихся после перенесённого пренатального стресса. В эксперименте использовали две группы животных: (1) контроль — животные, родившиеся у интактных самок, и (2) пренатальный стресс — животные, матери которых подвергались с 15 по 19 день беременности иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещённости. У пренатально стрессированных животных активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) снижается во фракциях ядер и митохондрий по сравнению с контрольной группой, тогда как активность глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7.) увеличивается в этих же субклеточных фракциях. Активность глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) у пренатально стрессированных крыс снижается в цитозоле и митохондриальной фракции по сравнению с контрольными животными. Перераспределение активности исследованных антиоксидантных ферментов в цитозоле, ядерной и митохондриальной фракциях ткани печени может вносить вклад в формирование патологического фенотипа пренатально стрессированных потомков.

Ключевые слова: пренатальный стресс; печень; глутатионпероксидаза; глутатионредуктаза; глутатионтрансфераза

DOI: 10.18097/PBMC20216704347

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время установлено, что пренатальный стресс различной этиологии (болевого, токсический, психоэмоциональный) вызывает у потомства нарушение механизмов адаптации, что проявляется в течение всей жизни [1, 2]. Стресс матери через воздействие глюкокортикоидных гормонов и катехоламинов длительно модифицирует регуляцию физиологических функций потомства, в том числе характер гормонального и поведенческого реагирования при стрессе. “Программирующее” влияние стероидных гормонов не ограничивается приспособительной деятельностью, формируя патологический фенотип в целом [3].

В исследованиях на животных моделях и у человека показано, что повышение уровня глюкокортикоидов при стрессе во время беременности приводит к снижению количества клеток в органах и тканях, эпигенетическим изменениям, сдвигам уровней ключевых транскрипционных факторов у пренатально стрессированного потомства. Во взрослой жизни у пренатально стрессированного потомства последствиями этих событий будут изменения в процессах метаболизма и возникновение патологий обмена веществ, в том числе резистентность к инсулину, метаболический синдром [2, 4]. В модели задержки внутриутробного развития у крыс наблюдались показатели, свидетельствующие о нарушении окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток печени [5].

Как известно, печень играет важную роль в процессах детоксикации, гомеостазе глюкозы, метаболизме липидов и стероидов [6]. Интенсивный метаболизм и высокий уровень митохондриального

дыхания, свойственные печени требуют усиленной работы антиоксидантных систем в цитозоле и митохондриях [7].

В гепатоцитах, как и в большинстве клеток, цитозольный компартмент является самым большим компартментом, а его системы восстановления глутатиона используются для осуществления процессов биосинтеза и репаративной активности.

Ядро клетки содержит генетическую информацию, для сохранности которой необходим высокий уровень концентрации глутатиона и связанных с ним антиоксидантных ферментов [8].

Окислительно-восстановительные потребности в каждом компартменте клетки различны [9]. Синтез энергетических эквивалентов в митохондриях сопровождается производством побочных продуктов в виде активных форм кислорода. Однако ограничения на молекулярный транспорт как между цитозолем и митохондриальным межмембранным пространством, так и между цитозолем и матриксом затрудняют механизмы реакций восстановления, в том числе такого важнейшего звена антиоксидантной системы, как глутатион. Предполагается, что NADPH-зависимая антиоксидантная система на основе глутатиона обеспечивает восстановление окисленного глутатиона митохондриальной глутатионредуктазой [10], в то же время многие антиоксидантные функции систем, связанных с глутатионом осуществляются белками семейства глутатионпероксидаз.

Принимая во внимание различия в функционировании антиоксидантной системы в разных компартментах клетки, нами была исследована активность глутатион-связанных ферментов в цитозоле, ядерной и митохондриальной

фракциях печени контрольных и пренатально стрессированных крыс. Одной из составляющих данной системы являются ферменты глутатионного пула: глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатионтрансфераза [11].

МЕТОДИКА

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург) с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Опыты проводили на крысах линии Wistar. Для получения пренатально стрессированного потомства первородящих беременных самок (возраст 5 месяцев, вес 250-270 г) подвергали однократному иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15 по 19 день гестации [12]. В эксперименте было использовано 12 самок, к которым подсаживали самцов (1 самец к 3 самкам). У самок ежедневно брали мазки с целью определения фазы эстрального цикла. Нулевым днем беременности считали день, когда в вагинальном мазке самки, находящейся в стадии эструса, обнаруживались сперматозоиды. На 18 день беременности самок рассаживали по отдельным клеткам, где они находились до родов и в процессе выкармливания потомства. Далее из каждого помёта в возрасте 30 дней отбирали случайным образом по одному самцу. Таким образом формировали группы контрольных (n=5) и пренатально стрессированных (n=5) животных. Дни беременности, в которые происходило стрессирование, были выбраны в связи с тем, что именно в это время идут интенсивные процессы органогенеза у эмбрионов, в том числе замещение сетчатой структуры печени на дольчатую; при этом происходят существенные изменения как в строении, так и в цитохимии паренхиматозных клеток [13]. Крыс-самцов, родившихся от стрессированных и контрольных самок, брали в опыт в возрасте 100 дней. К 100 дням формирование печени завершено, также завершается интеграция нервной, эндокринной и половой систем [12, 13]. Крыс декапитировали, печень выделяли на льду, в эксперимент брали левую боковую долю печени. Ткань промывали холодным физиологическим раствором, измельчали бритвой в чашке Петри на льду, промывали дважды средой выделения (0,25 М сахараза, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4) с фильтрацией через 2 слоя стерильной марли. Далее производили гомогенизирование ткани (гомогенизатор Поттера, "Sartorius", Германия) в среде выделения с конечным разведением гомогената 1:9 в пересчёте на вес сырой ткани, после гомогенизации пробы также фильтровали через 2 слоя стерильной марли. Выделение субклеточных фракций производили стандартным методом дифференциального центрифугирования (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия). Профильтрованный гомогенат центрифугировали (800 g, 10 мин, 4°C). После первого центрифугирования

супернатант отбирали в отдельную пробирку, осадок, содержащий фракцию ядер, трёхкратно промывали в исходном объёме среды выделения, после чего все полученные супернатанты были объединены. Осадок, содержащий ядра, аккуратно стальной лопаткой разделяли на 3 части в разные пробирки типа "эппендорф", после чего к каждой аликвоте осадка добавляли 300 мкл 0,05% тритона X-100 приготовленного на буфере для определения активности фермента, перемешивали стеклянной палочкой и через 15 мин центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g. Полученные супернатанты использовали для определения ферментативной активности в ядерной фракции. Объединенные супернатанты центрифугировали 20 мин при 15000 g для осаждения митохондрий. После центрифугирования полученный супернатант использовали для определения ферментативной активности в цитоплазматической фракции. Осадок митохондрий промывали средой выделения без ЭДТА и повторно центрифугировали при тех же условиях, что и для выделения митохондрий. С полученным осадком производили манипуляции, аналогичные проведенным с осадком ядер. Для определения общего белка по методу Лоури использовали аликвоты супернатантов с корректировочными стандартами. Активность глутатионпероксидазы определяли по методу Paglia и Valentine [14]. В основу определения активности глутатионредуктазы положен метод Carlberg и Mannervik [15]. Определение активности глутатионтрансферазы проводили согласно методу Habig и соавт. [16]. Активность исследованных ферментов выражали в количестве нмоль продукта реакции, образовавшегося в 1 мин в расчёте на 1 мг белка.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием критерия сравнения U (Манна-Уитни) и критерия множественных сравнений Краскела-Уоллиса в программе IBM SPSS Statistics 21. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. При описании количественных данных использовались следующие показатели: Me — медиана, IQR — интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе крыс активность глутатионпероксидазы во всех исследованных субклеточных фракциях достоверно не отличается (табл. 1). Активность глутатионредуктазы в цитозоле превышает значения этого показателя во фракциях ядра и митохондрий в 3 раза ($p < 0,05$). Активность глутатионтрансферазы в контрольной группе крыс во всех исследованных субклеточных фракциях достоверно не отличается. У пренатально стрессированных животных активность глутатионпероксидазы в цитозоле не изменяется по сравнению с контролем, в ядерной фракции снижается в 6 раз ($p < 0,05$), а в митохондриях не определяется. Активность глутатионредуктазы в цитозоле после пренатального стресса не изменяется

Таблица 1. Активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях печени контрольных и пренатально стрессированных крыс

Ферменты	Субклеточные фракции печени	Контроль (n=5)	Пренатальный стресс (n=5)
Глутатионпероксидаза	Цитозоль	22,4 (18,0-25,0)	25,8 (24,2-30,6) ^{##}
	Ядра	34,2 (27,6-38,5)	5,4 (0,0-10,9)*
	Митохондрии	45,3 (23,7-99,7)	0,0 (0,0-0,0)*
Глутатионредуктаза	Цитозоль	99,3 (89,2-110,2) [#]	89,2 (84,3-89,3) ^{###}
	Ядра	22,1 (18,4-23,5)	32,5 (30,8-33,8)*
	Митохондрии	30,1 (20,0-36,5)	60,0 (60,0-64,3)*
Глутатионтрансфераза	Цитозоль	43,9 (39,7-54,0)	29,2 (29,2-32,8)*
	Ядра	17,8 (7,6-36,4)	21,3 (16,6-24,9)
	Митохондрии	33,8 (27,8-46,0)	15,6 (16,1-27,8)*

Примечание: данные представлены в виде Me(IQR), где Me — медиана, IQR — интерквартильный размах в границах 25 и 75 перцентилей, # — достоверные отличия активности глутатионредуктазы между фракциями в контрольной группе крыс при $p < 0,05$, ## — достоверные отличия активности глутатионпероксидазы между субклеточными фракциями в группе пренатально стрессированных крыс при $p < 0,05$; ### — достоверные отличия активности глутатионредуктазы между субклеточными фракциями в группе пренатально стрессированных крыс при $p < 0,05$, * — достоверные отличия группы пренатально стрессированных крыс по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Таблица 2. Изменение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях печени у пренатально стрессированных крыс по сравнению с контрольной группой

Ферменты	Цитозоль	Фракция ядер	Фракция митохондрий
Глутатионпероксидаза	—	↓	↓
Глутатионредуктаза	—	↑	↑
Глутатионтрансфераза	↓	—	↓

Примечание: "↓" — снижение активности, "↑" — увеличение активности, "—" — отсутствие статистически значимых изменений.

по сравнению с контролем, в ядерной фракции увеличивается на 30%, оставаясь ниже уровня активности этого фермента в цитозоле, а в митохондриях увеличивается в 2 раза ($p < 0,05$), при этом достоверные отличия с фракцией цитозоля отсутствуют. Активность глутатионтрансферазы в цитозоле уменьшается на 30% по сравнению с контролем ($p < 0,05$), в ядерной фракции не изменяется, в митохондриях снижается в 2 раза ($p < 0,05$). При этом достоверные отличия активности фермента в исследованных фракциях отсутствуют.

Изменения активности глутатион-зависимых ферментов в субклеточных фракциях печени у пренатально стрессированных крыс представлены в таблице 2. Как видно из таблицы 2, эти изменения свидетельствуют о перераспределении ферментативной антиоксидантной активности в субклеточных фракциях.

Полученные результаты показали (табл. 1), что в группе контрольных крыс активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов в исследованных субклеточных фракциях печени достоверно не различается, за исключением повышенной активности глутатионредуктазы в цитозоле. Высокая активность этого фермента может быть обусловлена ролью, которую играет процесс восстановления глутатиона в цитозольном компартменте [17]. Считается, что основное биологическое значение фермента глутатионредуктазы заключается в поддержании высокого уровня

восстановленного глутатиона и низкого уровня окисленного глутатиона, что позволяет значительно уменьшить потребности в синтезе глутатиона *de novo*. Важность и эффективность глутатионредуктазы подчёркивает тот факт, что скорость восстановления окисленного глутатиона в большинстве тканей выше, чем синтез восстановленного глутатиона. Кроме того, функционирование глутатионредуктазы всегда сопряжено с ферментами, окисляющими глутатион в результате реакций восстановления, в том числе с глутатионпероксидазой и глутатионтрансферазой [17].

У пренатально стрессированных крыс активность глутатионредуктазы в цитозоле не изменяется по сравнению с контролем (табл. 1), но достоверно превышает активность фермента в ядерной фракции. Кулинский и Колесниченко [17] отмечают, что при неблагоприятных условиях активность глутатионредуктазы изменяется меньше чем активность других ферментов, связанных с глутатионовым пулом. По-видимому, биологическая роль этого фермента гораздо шире, чем только восстановление окисленного глутатиона.

Увеличение активности глутатионредуктазы в ядерной фракции, вероятно, необходимо для поддержания уровня восстановленного глутатиона, который участвует в процессах защиты ДНК от окислительных повреждений и используется для синтеза ДНК [18]. Рост уровня активности глутатионредуктазы в митохондриях печени у пренатально стрессированных крыс может быть

связан с повышенной потребностью в восстановленном глутатионе для процессов окислительного фосфорилирования у таких животных.

Образование окисленного глутатиона в реакциях с участием глутатионпероксидазы является основным источником этого дисульфида в клетке. По-видимому, пренатальный стресс является причиной нарушений в реакциях синтеза глутатиона, его восстановления и окисления в митохондриях и в ядерной фракции, а снижение активности глутатионпероксидазы, с одновременным увеличением глутатионредуктазы является компенсаторным процессом.

Как известно, глутатионтрансферазы детоксифицируют основные классы электрофильных ксенобиотиков, участвуют в биосинтезе простагландинов, некоторых стероидных гормонов и в деградации тирозина. Также глутатионтрансферазы участвуют в непрямо́й регуляции Nrf-2 — транскрипционного фактора, связанного с антиоксидантным ответом клетки [17]. Кроме того, в ядре глутатионтрансфераза обладает активностью глутатионпероксидазы, и её роль в защите ДНК неоспорима, поскольку этот фермент обеспечивает в ядре 86% общей глутатионпероксидазной активности [19]. В митохондриях глутатионтрансферазы и глутатионпероксидаза являются комплементарными. На основании этого можно предположить, что выявленное нами снижение активности глутатионтрансферазы в цитозоле и митохондриях приводит к патологическим изменениям в функционировании печени, вызванным пренатальным стрессом. При этом активность глутатионтрансферазы в ядре остается без изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проделанное исследование показало, что пренатальный стресс вызывает изменения активности глутатион-связанных антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях печени у взрослых крыс. В то же время, выявленные изменения говорят о достаточной сопротивляемости глутатионовой системы печени к стрессорным воздействиям. Однако снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы в митохондриях должно отразиться на энергетических процессах в печени. Одновременное снижение активности глутатионтрансферазы в цитозоле и митохондриальной фракции печени может нарушать процесс детоксикации, что, возможно, является одной из причин метаболического синдрома, часто возникающего у пренатально стрессированных индивидов. Обращает на себя внимание и снижение уровня активности глутатионпероксидазы во фракции ядер, возможно являющегося одной из причин формирования патологического фенотипа у пренатально стрессированных животных и человека. Таким образом, можно заключить, что:

1. пренатальный стресс изменяет соотношение исследованных антиоксидантных ферментов между субклеточными фракциями печени крыс;

2. наиболее выраженные изменения в активности глутатион-зависимых ферментов печени пренатальный стресс вызвал в митохондриях печени;

3. перераспределение активности исследованных антиоксидантных ферментов в цитозоле, фракции ядер и митохондриальной фракции ткани печени может вносить вклад в формирование патологического фенотипа пренатально стрессированных потомков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, тема № 0134-2019-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Otellin V.A., Khozhai L.I., Ordyan N.E.* (2007) Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. “Десятка”. Санкт-Петербург, 420 с. [Otellin V.A., Khozhai L.I., Ordyan N.E. (2007) Prenatalnye stressornye vozdeystviya & razvivayuschyisia golovnoy mozg. [Prenatal stress effects and the developing brain.] “Desyatka”. Saint Petersburg, 420 p.]
2. *Rinaudo P., Wang E.* (2012) *Annu. Rev. Physiol.*, **74**, 107-130.
3. *Entringer S., Wadhwa P.D.* (2013) *Nestle Nutr. Inst. Workshop*, **74**, 107-120.
4. *Balasubramanian P., Varde P., Abdallah S.L., Najjar S.M., MohanKumar P.S., MohanKumar S.M.J.* (2015) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**(6), E582-E588.
5. *Peterside I.E., Selak M.A., Simmons R.* (2003) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **285**(6), E1258-E1266.
6. *Rui L.* (2014) *Compr. Physiol.*, **4**, 177-197.
7. *Miller C.G., Schmidt E.E.* (2019) *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 532-543.
8. *Go Y.-M., Jones D.P.* (2010) *Antioxid. Redox Signal.*, **13**(4), 489-509.
9. *Wang R.-S., Oldham W.M., Maron B.A., Loscarlo J.* (2018) *Antioxid. Redox Signal.*, **29**(10), 953-972.
10. *Yin F., Sancheti H., Cadenas E.* (2012) *Antioxid. Redox Signal.*, **17**(12), 1714-1727.
11. *Ookhtens M., Kaplowitz N.* (1998) *Semin. Liver Dis.*, **18**(4), 313-329.
12. *Ordyan N.E., Pivina S.G.* (2004) *Neurosci. Behav. Physiol.*, **34**, 569-574.
13. *Зиматкин С.М., Марковец Н.И.* (2016) *Вестник ВГМУ*, **15**(3), 18-23. [Zimatkin S.M., Markavets N.I. (2016) *Vestnik VGMU*, **15**(3), 18-23.]
14. *Paglia D.E., Valentine W.N.* (1967) *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.

15. Carlberg I., Mannervik B. (1975) J. Biol. Chem., **250**(14), 5475-5480. PMID: 237922
16. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) J. Biol. Chem., **249**(22), 7130-7139. PMID: 4436300
17. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биомедицинская химия, **55**(4), 365-379. [Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. (2009) Biomeditsinskaya khimiya, **55**(4), 365-379.]
18. Смирнов Л.П., Суховская И.В. (2014) Ученые записки Петрозаводского государственного университета, №6, 34-40. [Smirnov L.P., Sukhovskaya I.V. (2014) Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta, no. 6, 34-40.]
19. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1993) Успехи современной биологии, **113**(1), 107-122. [Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. (1993) Biology Bulletin Reviews, **113**(1), 107-122.]

Поступила в редакцию: 19. 04. 2021.
После доработки: 18. 06. 2021.
Принята к печати: 21. 06. 2021.

THE EFFECT OF PRENATAL STRESS ON ANTIOXIDANT GLUTATHION-ASSOCIATED ENZYMES ACTIVITY IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RAT'S LIVER

A.V. Vyushina, A.V. Pritvorova, O.G. Semenova, N.E. Ordyan*

Pavlov Institute of Physiology of the RAS,
6 Makarova emb., St. Petersburg, 199034 Russia; *e-mail: PritvorovaAV@infran.ru

The activity of glutathione-associated antioxidant enzymes in subcellular fractions (cytosolic, mitochondrial, and cell nucleus fractions) was investigated in the liver of adult male Wistar rats born after prenatal stress was. Two groups of animals were studied in the experiment: (1) control group included — animals was born by intact mothers, and (2) prenatal stress group included animals whose mothers were subjected to immobilization stress in high-light conditions from the 15th to the 19th day of pregnancy. The activity of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in prenatally stressed animals decreased in the fractions of nuclei and mitochondria compared to the control group, while the activity of glutathione reductase (EC 1.8.1.7.) increased in the same subcellular fractions. The activity of glutathione transferase (EC 2.5.1.18) in prenatally stressed rats reduced in the cytosol and mitochondrial fractions as compared to control group. Redistribution of the antioxidant enzyme activity in the cytosol, the fraction of nuclei and the mitochondrial fraction of liver tissue may contribute to the formation of the pathological phenotype of prenatally stressed offspring.

Key words: prenatal stress; liver; glutathione peroxidase; glutathione reductase; glutathione transferase

Funding. The research was carried out within the framework of the State Task of the I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, topic No. 0134-2019-0002

Received: 19.04.2021, revised: 18.06.2021, accepted: 21.06.2021.