



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и
теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА АМИДИРОВАННОСТЬ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

И.А. БАДАЛЯН, С.В. АРУТЮНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
badalyania@mail.ru

Исследовались амидированность белков головного мозга интактных и подвергнутых гипоксии молодых и старых крыс, а также изменение содержания амидных групп белков при инкубировании гомогенатов головного мозга. Показано, что при старении снижается амидированность белков мозга за счет легкогидролизуемой фракции. В условиях гипоксии происходит свойственное процессам торможения амидирование белков мозга, причем у старых крыс в большей степени, чем у молодых. В течение трехчасовой инкубации гомогенатов в обеих возрастных группах наблюдалось дезамидирование белков, происходящее за счет легкогидролизуемых амидных групп белков мозга.

Гипоксия – амидные группы белков – легко- и трудногидролизуемые амидные группы

Ուսումնասիրվել է գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացումն ինտակտ ու հիպոքսիայի ենթարկված երիտասարդ և ծեր առնետների մոտ, ինչպես նաև սպիտակուցների ամիդային խմբերի պարունակության փոփոխությունը գլխուղեղի հոմոգենատներն ինկուբացնելիս: Ցույց է տրված, որ ծերացման ժամանակ նվազում է գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացման աստիճանն՝ ի հաշիվ հեշտ հիդրոլիզվող ֆրակցիայի: Հիպոքսիայի պայմաններում տեղի է ունենում արգելակման գործընթացներին բնորոշ գլխուղեղի սպիտակուցների ամիդացում, ընդ որում ծեր առնետների մոտ ավելի մեծ չափով, քան երիտասարդների մոտ: Հոմոգենատների երեքժամյա ինկուբացման ընթացքում երկու տարիքային խմբերում էլ դիտվում էր սպիտակուցների դեզամիդացում՝ գլխուղեղի սպիտակուցների հեշտ հիդրոլիզվող ամիդային խմբերի հաշվին:

*Հիպոքսիա – սպիտակուցների ամիդային խմբեր –
հեշտ և դժվար հիդրոլիզվող ամիդային խմբեր*

Brain protein amidation of intact and hypoxia impacted young and old rats as well as changes in the content of protein amide groups during incubation of brain homogenates have been studied. It is shown that at aging brain proteins amidation level decreases at the expense of weak hydrolysable fraction. Under hypoxia conditions the amidation of brain proteins takes place, which is typical for inhibition processes, furthermore, in case of old rats, the amidation level is more than in case of the young ones. During three hours incubation of homogenates in both age groups it is observed deamidation of proteins at the expense of weak hydrolysable amide groups of brain proteins was observed.

Hypoxia – protein amide groups – weak and hard hydrolyzable amide groups

В механизмах аммиакообразования и обезвреживания аммиака определенная роль приписывается амидным группам (АГ) белков тканей. Предполагалось, что при инкубации гомогенатов тканей в процессе интенсивного аммиакообразования, наряду с известными источниками, принимают участие и амидные группы белков. Однако было показано, что при инкубации гомогенатов головного мозга сумма амидных групп белков очищенного трихлоруксусного (ТХУ) осадка гомогената не претерпевает изменений, несмотря на наблюдаемое перераспределение между легко- и трудногидролизуемыми фракциями амидных групп, в результате чего было сделано заключение о непричастности амидных групп белков к процессу аммиакообразования при инкубировании гомогенатов [2].

Неоспоримым фактом является изменение амидированности белков головного мозга в зависимости от функционального состояния организма, а также его реакций на действие экстремальных факторов окружающей среды. Доказано, что процессы возбуждения, протекающие в мозге животных, вызывают, наряду с интенсивным расходом энергетических субстратов, также расщепление амидных групп белков головного мозга. Так, дезамидирование белков головного мозга наблюдается при электрическом возбуждении [7], при гипероксии [9], при алкогольной интоксикации [4], в постреанимационном периоде [10], в результате введения в организм инсулина, камфоры [7]. При развитии же тормозных процессов в мозгу – во время естественного сна, зимней спячки, акклиматизации животных к холоду [5], при действии вибрации [13], гипоксии [3], введении нембутала и мексидала [7], наоборот, происходит амидирование белков ткани.

Целью настоящей работы являлось изучение амидированности белков головного мозга при старении, а также влияние гипоксии на амидные группы белков старых крыс и их динамику при инкубировании гомогенатов тканей.

Материал и методика. Исследования проводили на молодых (4-6 мес.) и старых (24 мес.) белых крысах в нормальных условиях и условиях гипоксии, созданных в барокамере с давлением 335 мм рт. ст., соответствующее высоте 6 км над уровнем моря, с кратковременной выдержкой в течение 20 мин животных на этой высоте. Сразу после спуска животных подвергали декапитации, готовили гомогенат мозга в 0.05 М К-фосфатном буфере, pH=7.4. До и после трехчасовой инкубации гомогенатов в ТХУ-осадках, очищенных от азотсодержащих соединений и липидов, определяли белковый амидоазот методом жесткого кислотного гидролиза по количеству выделившегося аммиака. При определении суммы амидных групп (САГ) осадки подвергались гидролизу в 1 N H₂SO₄ в течение 180 мин, при определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ), принадлежащих аспарагину, – 30 мин. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ), принадлежащие глутамину, определяли по разности САГ и ЛАГ [11]. Содержание аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой [12]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В процессе старения организма происходит изменение свойств белков, в том числе и мозга, в результате программы синтеза или посттрансляционных модификаций, которые должны затронуть наиболее лабильные функциональные группы, участвующие в трансформационных изменениях белков. К числу функциональных групп, играющих важную роль в формировании структуры и активных центров белков, относятся амидные группы.

Результаты наших исследований по содержанию амидных групп белков мозга крыс при старении, а также динамика амидных групп при трехчасовой инкубации гомогенатов мозга приведены в табл. 1.

Согласно приведенным данным, САГ белков мозга старых крыс составляет 20,5 мкМ/г, что свидетельствует о снижении содержания амидных групп на 5,13 мкМ/г по сравнению с молодыми животными. Также выявлено снижение содержания ЛАГ на 3,46 мкМ/г и ТАГ на 1,67 мкМ/г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при старении организма происходит снижение амидированности белков головного мозга почти на 20 % и это уменьшение обуславливается в большей степени за счет ЛАГ, принадлежащих аспарагину. Уменьшение содержания амидных групп в белках ряда тканей в процессе старения показано и другими авторами [1, 6, 8].

Таблица 1. Содержание амидного азота белков головного мозга молодых и старых крыс до и после трехчасовой инкубации гомогенатов (мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0.05)

Условия опыта	Сумма амидных групп (САГ)			Легкогидролизуемые амидные группы (ЛАГ)			Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ)		
	И н к у б а ц и я								
	До	После	Разность	До	После	Разность	До	После	Разность
Молодые	25.63± 1.03	25.75± 1.01	0.12	14.75± 1.38	18.0± 1.53	3.25	10.88± 1.12	7.55± 0.89	-3.33
Старые	20.50± 1.12	20.12± 1.10	-0.38	11.29± 1.04	9.07± 1.20	-2.22	9.21± 1.32	11.05± 1.19	1.84
Снижение со- держ. АГ	5.13			3.46			1.67		

При трехчасовой инкубации гомогенатов мозга старых крыс получены следующие данные: содержание САГ белков до и после инкубации остается без изменений – 20,50 мкМ/г до и 20,12 мкМ/г после инкубации. Наблюдается перераспределение амидных групп между ЛАГ и ТАГ: ЛАГ уменьшается на 2,22 мкМ/г, тогда как ТАГ увеличивается на 1,84 мкМ/г. Перераспределение между фракциями амидных групп при различных функциональных состояниях мозга в результате трансформационных изменений белков было отмечено рядом авторов [10]. Из приведенных нами данных видно, что как в случае с молодыми, так и со старыми крысами при инкубировании гомогенатов мозга прослеживается та же динамика, что свидетельствует о том, что при старении организма амидные группы белков мозга также не участвуют в процессах аммиакообразования при инкубации гомогенатов.

Результаты исследований по влиянию гипоксии на амидированность белков мозга старых крыс приведены в табл. 2.

Согласно полученным данным, под действием гипоксии происходит амидирование белков мозга, свойственное процессам торможения. САГ белков в условиях гипоксии увеличивается до 28,02 мкМ/г, по сравнению с содержанием амидных групп интактных старых крыс (на 7,52 мкМ/г). Значительное увеличение амидированности наблюдается в легкогидролизуемой фракции белков (16,91 мкМ/г), и превосходит ее содержание в нормальных условиях на 5,62 мкМ/г. В трудногидролизуемой фракции увеличение содержания амидных групп происходит лишь на 1,9 мкМ/г. Результаты представленной серии свидетельствуют о том, что под воздействием гипоксии увеличение амидных групп белков

мозга старых крыс также как и молодых [3] происходит за счет легкогидролизуемой фракции белков.

При инкубировании гомогенатов мозга старых крыс, подвергнутых гипоксии, выяснилось, что амидированность белков не остается неизменной, как в случае с интактными животными, а снижается на 3,02 мкМ/г. Однако происходящее дезамидирование белков гомогенатов мозга старых крыс происходит не так интенсивно, как в гомогенатах мозга молодых крыс, и амидированность белков после инкубации не спускается до уровня интактных крыс, как это наблюдалось в экспериментах с молодыми животными [3]. Происходящее дезамидирование белков при инкубации гомогенатов происходит за счет ЛАГ – 2,88 мкМ/г, при этом уровень ТАГ почти не меняется.

Таблица 2. Содержание амидного азота белков головного мозга старых интактных и подвергнутых гипоксии крыс (мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0.05)

Условие опыта	Сумма амидных групп (САГ)			Легкогидролизуемые амидные группы (ЛАГ)			Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ)		
	И н к у б а ц и я								
	До	После	Разница	До	После	Разница	До	После	Разница
Интактные	20.50± 1.12	20.12± 1.10	-0.38	11.29± 1.04	9.07± 1.20	2.22	9.21± 1.32	11.05± 1.19	1.84
Подвергнутые гипоксии	28.02± 1.38	25.0± 1.25	-3.02	16.91± 1.02	14.03± 0.97	-2.88	11.11± 1.09	10.97± 1.12	-0.14
Снижение со- держ. АГ	7,52			5.62			1.9		

На основании приведенных данных можно заключить, что при старении уровень амидированности белков головного мозга крыс снижается. В условиях гипоксии в мозгу старых крыс наблюдается амидирование белков, свойственное процессам торможения. При инкубировании гомогенатов мозга крыс, подвергнутых гипоксии, отмечено, что дезамидирование белков мозга старых крыс происходит в меньшей степени, нежели у молодых. Существенно, что во всех случаях наблюдаемые изменения амидированности белков мозга происходят за счет ЛАГ, принадлежащих аспарагину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян Г.В., Мкртчян Г.А., Паронян Ж.А. Субклеточное распределение амидных групп белков мозга при старении. *Нейрохимия*, 1, 3, с. 243-247, 1982.
2. Бадалян И.А., Давтян М.А. Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс. *Нейрохимия*, 1, 4, с. 384-390, 1986.
3. Бадалян И.А., Дилбарян А.С., Давтян М.А. Амидированность белков головного мозга крыс при гипоксии. Доклады НАН РА, 113, 4, с. 391-395, 2013.
4. Векслер И.Я., Магомедова К.М. Амидные группы белков головного и спинного мозга при острой и хронической алкогольной интоксикации. *Укр. биохим. ж.*, 53, 3, с. 7-12, 1981.
5. Готлобер И.В. Амидные группы и аминокислоты белков мозга акклиматизированных к холоду крыс при последующих стрессовых

-
- воздействиях. В кн.: Материалы III Сев.-Кав. биохим. конф. Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, с. 94-95, 1976.
6. *Дурканаева О.А.* Амидированность и окислительные модификации белков тканей крыс и сывороточного альбумина при модельном и физиологическом старении. Дис. канд. биол. наук, Ростов-на-Дону, 2012.
 7. *Кометиани П.А., Клейн Е.Э., Гоциридзе Е.Г., Алексидзе Н.Г.* О белках головного мозга, чувствительных к ингибиторам памяти, и белках, содержащих метаболически активный амидный азот. 5-ая Всесоюзн. конф. по нейрохимии, Тбилиси, Изд-во Мецниереба, с. 87-101, 1970.
 8. *Кричевская А.А., Лукаш А.И., Пушкина Н.В., Шепотиновская И.В.* Роль посттрансляционного дезамидирования белков в процессе старения. 4-ая Закавказская конф. геронтологов и гериатров, Ереван, с. 52-54, 1980.
 9. *Новикова Е.И.* Действие гипероксии на белки сыворотки крови и мозга крысы. Деп. в ВИНТИ 12 августа, № 3555-80, 1980.
 10. *Папян А.А.* Амидные группы белков мозга при умирании и оживлении организма. Журн. exper. и клинич. медицины, 14, 5, с. 28-32, 1974.
 11. *Пушкина Н.В., Лукаш А.И.* Легко- и трудногидролизуемые амидные группы в белках. Известия Сев.-Кав. научн. центра высш. шк. Естеств. Науки, 2, с. 95-97, 1976.
 12. *Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А.* Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопр. мед. химии, 8, 5, с. 538-544, 1962.
 13. *Симонян Л.П., Папян К.М., Бадалян И.А.* Влияние вибрации на аммиакообразование в мозгу крыс. Материалы республиканской молодежной научн. конф. "Экологическая наука в Армении", с. 146-153, 2001.

Поступила 20.10.2015