Активность Аконитазы Головного Мозга Белых Крыс После Пренатальной Гипоксии

С.Н. Баба-заде, Т.М. Агаев

Институт физиологии им. А.И.Гараева НАНА, ул.Шариф-заде,2, Баку AZ 1100, Азербайджан

Исследованы изменения активности митохондриальной и цитоплазматической аконитазы в головном мозге белых крыс разного возраста, подвергнутых гипоксии в период органогенеза пренатального развития. Установлено, что пренатальная гипоксия в постнатальном развитии увеличивает активность аконитазы, причем, этот процесс носит обратимый характер.

Ключевые слова: *Гипоксия, головной мозг крыс, аконитаза*

ВВЕДЕНИЕ

Аконитаза иначе называемая аконитатгидратаза, (КФ 4.2.1.3), является одним из ферментов цикла трикарбоновых кислот. Фермент обратимо превращает лимонную кислоту в изолимонную кислоту и тем самым поддерживает, так называемое аконитазное равновесие состоящее из 91% цитрата, 6% изоцитрата и 3% цис-аконита. Аконитаза обнаружена в клетках животных, растений и микроорганизмов (Зайчикова,2010). Аконитаза относится к тем немногим белкам, которые в клетке выполняют несколько функций: в железосодержащей форме он катализирует одну из реакций цикла Кребса (обратимое превращение лимонной кислоты в изолимонную), а при окислительном стрессе в форме без иона железа связывается с регуляторным элементом мРНК ферритина и репрессирует ее трансляцию, а также связывается с элементами нестабильности в мРНК рецептора трансферрина и защищает эту мРНК от деградации. При увеличении в клетке количества двухвалентного железа фермент самопроизвольно регенерируется и образует цитозольную аконитазу (William, 2006).

Активные формы кислорода образуются в клетках в ходе нормальных метаболических реакций, однако, их содержание значительно повышается при гипоксии, которая приводит к окислительному стрессу. В настоящее время аконитазарассматривается в качестве чувствительной и критической мишени действия свободных радикалов в условиях окислительного стресса. При этом происходит резкое снижение активности фермента (Gardner, 1994; Murakamiand, Yoshino, 1997). Несмотря на то, что ферменты цикла трикарбоновых кислот локализованы в митохондриях, помимо митохондральной, имеется и цитоплазматическая аконитаза.

Несмотря на то, что фермент изучается с 40-ых годов XX века, в литературе нет количественных данных о содержании в тканях головного мозга животных цитоплазматической и митохондриальных форм аконитазы.

Гипоксия оказывает влияние на активность многих ферментов. Имеются данные, что гипоксия, перенесенная плодом в период органогенеза сказывается в постнатальном периоде развития (Журавин, 2009).

Целью данной работы является изучение влияния пренатальной гипоксии в периоде органогенеза на активность аконитазы в различных частях головного мозга белых крыс в постнатальном развитии. Представленная работа может помочь в решении некоторых вопросов энергоснабжения головного мозга в стрессовых ситуациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на самках беспородных белых крыс в количестве 20 голов. Самки в период органогенеза плода три дня в течение 10 мин подвергались гипоксии в специальной камере газовой смесью, состоящей из 95% азота и 5% кислорода. Полученное от них потомство делилось на три группы и выращивалось до достижения требуемого возраста: 17-ти дней, 1-го и 3-х месяцев. Эти возрасты считаются критическими в постнатальном развитии крыс. После окончания каждой серии опытов животных декапитировали, извлекали головной мозг и отделяли орбитальную., сенсомоторную., лимбическую кору, гипоталамус и мозжечок (Светухин,1968). Ткани гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1:9, центрифугировали при 20 000g в течение 20 мин для отделения митохондриальной фракции от цитозольной жидкости. Все эти процедуры про-

водили при 0-4ºС. В цитозольной и митохондриальных фракциях определяли активность аконитазы по методу (Guilbauli, 1976), белок определяли по методу Лоури (Кочетов, 1980).

Опыты проводили в 6-кратной биологической и 2-кратной аналитической повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев (Ллойд и Ледерман, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов экспериментов видно (Рис.1), что в цитозоле исследованных тканей головного мозга контрольных крыс трех возрастов максимальная активность аконитазы наблюдается у одномесячных животных, особенно в лимбической коре и мозжечке. В цитозоле тканей 17-ти дневных контрольных животных активность аконитазы намного ниже активности фермента остальных возрастных групп. Это наиболее четко видно на примере гипоталамуса, лимбической и сенсомоторной коры. Полученные данные хорошо согласуются с особенностями постнатального развития крыс. Так, известно, что к17-му дню постнатального развития у крысят открываются глаза, но головной мозг еще не завершил формирование и поэтому его функционирование не требует больших затрат энергии. С 17 по 35 день развития в мозге происходит процесс миелинизации нейронов. На этот процесс требуется значительное количество АТФ, а к 3-х месячному возрасту крысы вступают в половозрелый возраст.

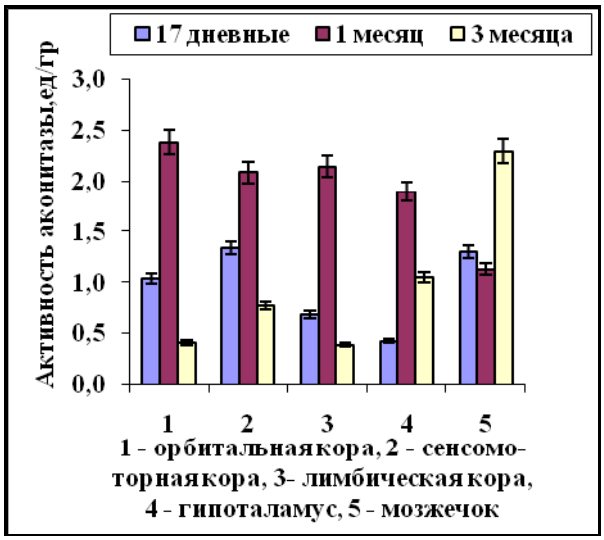

Рис. *1.* Активность аконитазы в цитозольной фракции контрольных крыс

Активность цикла Кребса неразрывно связана с процессом гликолиза. В ответ на гипоксию (Анохина, 2010) в головном мозге появляется белок HIF-1 (hepoxia inducible factor), который способен регулировать транскрипцию более 60-ти белков, в том числе ферментов гликолиза (Меерсон, 1993). Имеются данные, что при этом активность гексокиназы (ГК) увеличивается на 23% и фосфофруктокиназы – на 50% (Sermnza, 2006). Гипоксия вынуждает организм животных оптимизировать энергетический обмен за счет появления в клетках митохондрий, обладающих меньшими размерами, со сниженным содержанием цитохромов, высокой активностью митохондриальных ферментов, имеющими более низкое сродство к своим субстратам, а также повышением эффективности окислительного фосфорилирования (Лукьянова, 2003). Активизация гликолиза приводит к увеличению количества ацетил-коэнзимаА, необходимый для синтеза лимонной кислоты – субстрата аконитазы. Увеличение количества субстрата приводит к активации как митохондриальной, так и цитоплазматической аконитазы. В мозге взрослых животных 65-70% изоцитрата окисляется НАД-зависимой цзоцитратдегидрогеназой, а у молодых, растущих животных большая часть цзоцитрата окисляется в цитозоле НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназой и образующийся НАДФН используется для биосинтеза липидов мозга (АшмариниСтукалов, 1996). Пренатальная гипоксия приводит к изменениям активности фермента в цитозоле изученных тканей животных всех возрастов (Рис.2). В цитозоле тканей 17-ти дневных опытных животных наблюдается резкое (в 2-5 раз) увеличение аконитазной активности ($p<0,001$).

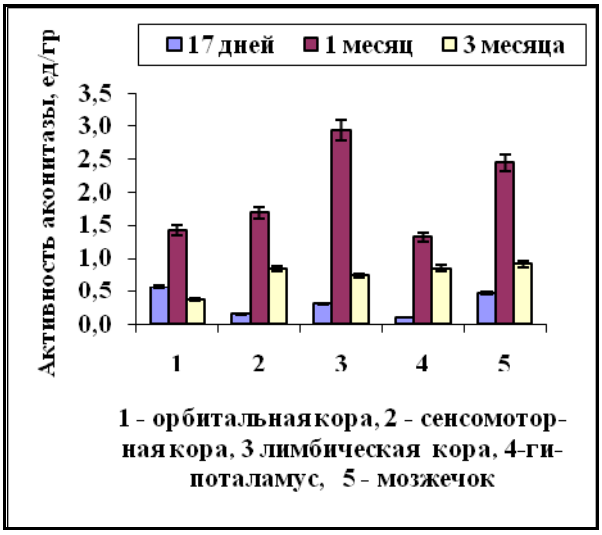

Рис. *2.* Активность аконитазы в цитозольной фракции гипоксированных крыс

Эти результаты доказывают, что пренатальная гипоксия в исследованных тканях го-

ловного мозга 17-ти дневных крыс усиливает биосинтетические процессы. Активность аконитазы в цитозоле большинства тканей пренатально гипоксированных одномесячных крыс увеличивается. Лишь в мозжечке активность фермента в 2-2,5 раза ниже контроля ($p<0,001$) и в лимбической коре наблюдается недостоверное снижение активности фермента ($p> 0,05$).

В цитозоле 3-х месячных гипоксированных животных только в мозжечке наблюдается 3-х кратный рост активности аконитазы ($p<0,001$), а в остальных тканях имеют место незначительные изменения.

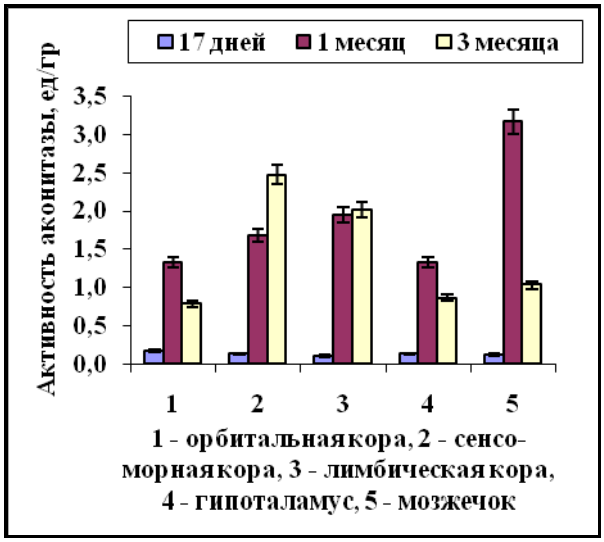

Рис. *3.* Активность аконитазы в митохондриальной фракции контрольных крыс.

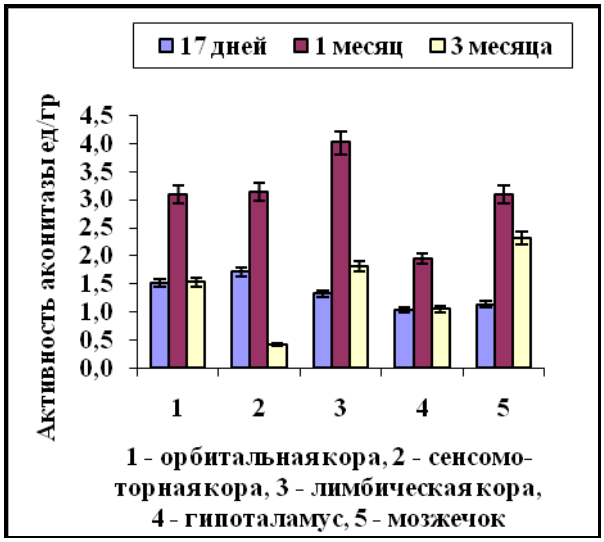

Рис. *4.* Активность аконитазы в митохондриальной фракции гипоксированных крыс

Рост активности аконитазы в цитозоле 17-ти дневных и месячных крыс можно объяснить сохранением в танях головного мозга крыс функционирования оптимизированной схемы энергоснабжения, а у 3-х месячных крысах, за исключением мозжечка, в цитоплазме происходит восстановление нормального функционирования.

Интересно сравнить активность аконитазы в цитозольной и митохондриальной фракциях. Как уже отмечалось выше, эти ферменты в клетке используются для выполнения разных функций.

Результаты экспериментов показаны на (Рис.3). Как видно из рис.1 и 3, активности фермента в обеих фракциях 17-ти дневных и одномесячных контрольных животных приблизительно одинаковы. Кардинально меняется соотношение ферментов лишь в тканях 3х месячных животных, где наблюдается значительное увеличение активности фермента в митохондриях по сравнению с цитозолем ($p<0,0050$). Эти результаты можно объяснить тем, что в головном мозге 17-ти дневных и месячных крыс идет биосинтез липидов, образование необходимого для этого процесса НАДФН обеспечивается цитоплазматической аконитазой. В тканях 3-х месячных крыс процесс усиленного биосинтеза завершен и головной мозг переходит на путь получения энергии в цикле Кребса, что приводит к активации ферментов цикла Кребса, в том числе и митохондриальной аконитазы.

На (Рис.4) показаны результаты действия пренатальной гипоксии на митохондрии. Многократный рост активности фермента в митохондриях тканей 17-ти дневных животных по сравнению с контролем практически идентичен росту активности фермента в цитозольной фракции ($p<0,01$).

В митохондриях одномесячных гипоксированных крыс активность фермента выше, чем в других возрастных группах и в среднем в 2 раза превышает контрольные показатели, за исключением мозжечка, в котором активность фермента не изменяется. Эти изменения вызваны теми же причинами, которые меняют активность цитоплазматической акотиназы.

Более сложная картина наблюдается в митохондриях 3-х месячных животных. В мозжечке происходит увеличение, в сенсо-моторной - снижение, а в лимбической и орбитальной коре и гипоталамусе активность аконитазы очень близка к контрольным значениям. Заметно, что изменения активности фермента в митохондриальной фракции во многом идентичны изменениям активности в цитозоле. Разница только в том, что в митохондриях гипоксированных крыс активность фермента в сенсомоторной коре снижается в 5 раз, а в цитозоле она не меняется.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что пренатальная гипоксия пло-

да в период органогенеза в постнатальном онтогенезе увеличивает активность как митохондриальной, так и цитоплазматической аконитазы, причем, этот процесс, имеет обратимый характер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ашмарин И.П., Стукалова П.В. (1996) Нейрохимия: учебник для биологических и медицинских вузов. Изд-во ИБХ РАМН, 470 с.

Анохина Е.Б., Буравкина Л.Б. (2010) Механизмы регуляции транскрипционного фактора при гипоксии. *Биохимия,* **75:**185-196.

Зайчикова М.В., Альнасер А., Королькова А.О., Епинцев А.Т. (2010). Регуляторные и кинетические характеристики цитоплазматической аконитазы из растительных и животных тканей. *Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация,* **2:** 81-84.

Кочетов Г.А. (1980) Практикум по общей биохимии. М.: 331 с.

Светухин В.М. (1968) Цитоархитектоника новой коры головного мозга в отряде грызунов. *Архив анатомии, эмбриологии и гистологии,* **42(№2):** 31-45.

Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Справочник по прикладной статистике. Финансы и статистика. В двух томах. М.: **2:**526.

Лукьянова Л.Д. (2003) Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма. *Физиол. журн.,* **49(3):** 17-35

Меерсон Ф. З. (1993) Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. М.: Hypoxia Medical, 331с.

Gardner P.R., Nguyen D.D., White C.W. (1994) Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **91:**12248-12 252.

Murakami K., Yoshino M. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.,* **41:**481-486.

Frazee R.W., Walden W.E., Theil E.C. (1995) Aconitase activities of FeS IRP-1 and m-aconitase: Evolution of the RNA binding properties coincide with low activity and sensitivity to degradation. *Journal of Inorganic Biochemistry,* **59(2):**547-547.

Semea G.I., Roth P.H., Fang H.M.,Wang G.I. (2006) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor I. *Journal of Experimental Biology,* **209:** 3851-3861.

Walden WE., Selezneva A.I., Dupuy J., Volbeda A., Fontecilla-Camps J.C., Theil E.C., VolzK. (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Journal of Science,* **314(5807): 1**903-1908.

Prenatal Hipoksiyadan Sonra Baş Beyində Akonitazanın Fəallığı

Baba-zadə S.N., Ağayev T.M.

AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu

Prenatal inkişafın organogenez dövründə hipoksiyaya məruz qalmış müxtəlif yaşlı ağ siçovulların baş beynində mitoxondrial və sitoplazmatik akonitazanın fəallığının dəyişilməsi öyrənilib. Müəyyən edilib ki, prenatal hipoksiya posnatal inkişaf zamanı akonitazanın fəallığını artırır və bu prosses dönər xasiyyətlidir.

Açar sözlər: *Hipoksiya,siçanların baş beyni, akonitaza*

Activity of Brain Aconitase of Albino Rats after Prenatal Hypoxia

Baba-zade S.N., Agayev T.M.

Institute of Physiology named after A.I. Garayev, ANAS

Changes in activities of mitochondrial and cytoplasmic aconitase in the brains of albino rats of different ages subjected to hypoxia in the period of organogenesis of prenatal development were studied. It has been shown that prenatal hypoxia upregulates aconitase activity in postnatal development and this process, probably, has a reversible character.

Key words: *Hypoxia, albino rat's brain, aconitase*