

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЛИИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС

© 2020 г. А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова^{1,*}, О. Г. Семенова¹, Н. Э. Ордян¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 02.09.2019 г.

Было исследовано влияние пренатального стресса на активность глутатионсвязанных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса крыс. Результаты проведенного исследования показали, что пренатальный стресс вызывает изменения в активности исследованных ферментов как в нейронах, так и в нейроглии неокортекса. Эти изменения различаются в субклеточных фракциях исследованных клеточных популяций. Во фракции ядер нейронов и нейроглии активность глутатионпероксидазы возрастает. В цитозоле нейронов активность глутатионпероксидазы снижается, а в цитозоле нейроглии растет. Во фракции митохондрий нейронов активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы растет, а во фракции митохондрий нейроглии активность глутатионпероксидазы снижается. Сделано предположение о том, что изменение активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии является одной из причин устойчивости неокортекса к воздействию пренатального стресса.

Ключевые слова: пренатальный стресс, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза, нейроны, нейроглия, субклеточные фракции

DOI: 10.31857/S1027813320020132

ВВЕДЕНИЕ

Пренатальный стресс любой этиологии является предрасполагающим фактором для развития заболеваний ЦНС. При экспериментальных исследованиях было обнаружено, что материнский стресс может привести к негативным изменениям в нервной системе пренатально стрессированных потомков [1, 2]. Одной из причин этого является изменение цитоархитектоники коры. Кроме того, выявлены изменения дифференцировки коры в процессе пренатального онтогенеза, которые являются результатом, как повреждений клеток коры, так и налагающимися на это процессами репарации [3].

Нами было показано, что пренатальный стресс вызывает изменения процессов свободнорадикального окисления белков и липидов в структурах мозга крыс, при этом в коре головного мозга изменения уровня свободнорадикального окисления биомолекул значительно менее выражены по сравнению с исследованными подкорковыми структурами [4, 5]. Одним из механизмов такой устойчивости коры к стрессорным воздействиям

может являться ее гетерогенная структура. Кроме того, нейроны и нейроглия имеют различия по качественному и количественному составу биомолекул, изоферментному составу и активности ферментативных систем, чувствительности к внешним воздействиям [6–9]. Показано, что ансамбли нейронов и нейроглии реагируют на окислительный стресс разнонаправленными изменениями [10].

В настоящее время установлено, что глиальные клетки необходимы для гомеостаза нейронов и защищают их от повреждений, связанных, в том числе, и с окислительным стрессом [11]. Как показано в обзоре Paul S. Waxter [12] в нейроглии глутатион синтезируется в ответ на окислительный стресс и далее используется для регуляции антиоксидантного баланса в нейронах.

Глутатион, являясь как неферментным антиоксидантом, так и косубстратом ряда антиоксидантных ферментов, имеет решающее значение для системы глутатионового пула в нейроглиальных взаимоотношениях. Глутатион встроен в циклическую систему антиоксидантных ферментов, которая в упрощенном виде состоит из глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы. Используя восстановленный глутатион в качестве

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: pritvorovaav@infran.ru.

косустрата, глутатионпероксидазы инактивируют органические перекиси разнообразного происхождения, а глутатионтрансферазы превращают гидрофобные перекисные соединения в гидрофильные производные. Глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион. Активности глутатионтрансфераз и глутатионпероксидаз частично перекрываются. В особенности это важно для ядра клетки, где трансферазы обеспечивают 80% пероксидазной активности, а кроме того входят в группу ферментов, участвующих в процессах репарации ДНК [13]. Было показано, что глутатионовые ферменты по-разному экспрессируются в субклеточных фракциях [9]. Причиной этого может являться то обстоятельство, что продукция АФК неодинакова в разных компартментах клетки.

Принимая во внимание всю сложность процессов формирования нейронально-глиальных комплексов при пренатальном стрессе, целью данной работы было изучение активности связанных с глутатионом антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных особей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из биокolleкции “Colleкция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России, 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 беременных самок подвергали одночасовому иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности [14] с 15-го по 19-й день гестации. Крыс-самцов, родившихся от стрессированных и контрольных самок, брали в опыт в возрасте 100 дней. Крыс декапитировали, из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли неокортекс от 4 особей в одну пробу. Клеточные фракции, обогащенные нейронами и нейроглией, выделяли по методу Селлинджера в модификации Флерова [15]. Выделение субклеточных фракций производилось стандартным методом дифференциального центрифугирования. Активность глутатионпероксидазы определялась по методу Paglia D.E. и Valentine W.N. [16]. В основу определения активности глутатионредуктазы положен метод Carlberg I. и Mannervik B. [17]. Определение активности глутатионтрансферазы проводили согласно методу Habig W.H. и соавторов [18]. За единицу активности исследованных ферментов принимали количество нмоль продукта реакции, образовавшегося

в 1 мин в расчете на 1 мг белка. Количество белка определялось по методу Лоури.

Статистическая обработка полученных результатов производилась с использованием критерия сравнения U (Манна–Уитни) в программе “IBM SPSS Statistics 21”. Проверку статистических гипотез проводили при уровне значимости $p = 0.05$. При описании количественных данных использовались следующие показатели: Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, полученные при исследовании активности ферментов глутатионового пула в цитозоле, фракциях ядер и митохондрий нейронов и нейроглии в контрольной группе крыс, представлены в табл. 1. Из трех исследованных ферментов в цитозоле нейронов была выявлена активность только у глутатионпероксидазы. Активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы не обнаружена. Во фракции ядер была выявлена активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, активность глутатионредуктазы не обнаружена. В митохондриальной фракции нейронов активность исследованных ферментов не выявлена.

В нейроглии активность исследованных ферментов была достаточно высокой по сравнению с нейронами ($p < 0.05$). Исключение составили: активность глутатионпероксидазы в цитозоле, которая была ниже в нейроглии, и активность глутатионредуктазы в митохондриальной фракции, которая не была выявлена ни в нейронах, ни в нейроглии.

Изменение активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс показано в табл. 2.

У пренатально стрессированных животных в нейронах активность глутатионпероксидазы в цитозоле снижалась и составляла всего 6% от уровня контроля, активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы так же как и в контроле не определялась. Во фракции ядер нейронов активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы не имела достоверных отличий от контроля, тогда как активность глутатионредуктазы повышалась ($p = 0.005$). В митохондриальной фракции активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы достоверно увеличивалась ($p = 0.005$).

В нейроглии у пренатально стрессированных крыс активность глутатионпероксидазы в цитозоле увеличивалась в 7 раз ($p = 0.005$), остальные два фермента не изменяли активность по сравнению с контрольными крысами. В ядерной фракции ак-

Таблица 1. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нМ/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса контрольных крыс, Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

Группа	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	274.5 (195–305)	7.5 (0–15.2)	0.0 (0–0)	32.1 (12.1–76.4) [#]	29.8 (13.1–33.9) [#]	898.5 (381.8–1237) [#]
ГР	0.0 (0–0)	0.0 (0–0)	0.0 (0–0)	40.8 (23–126.3) [#]	36.9 (17.7–98.2) [#]	0.0 (0–0)
ГТ	0.0 (0–2)	5.9 (3.1–9.6)	0.0 (0–0)	13.1 (7.5–26.1) [#]	25.4 (15.6–34.5) [#]	79.5 (35–135) [#]

Примечание: Me(IQR), где Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей, Ц – цитозоль, Я – фракция ядер, М – фракция митохондрий, [#] отличие нейроглии от нейронов при $p < 0.05$.

Таблица 2. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нМ/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса пренатально стрессированных крыс Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

Группа	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	23.5 (0–38.2)*	28.0 (13.2–46.0)*	164.5 (101.0–286.0)*	197.5 (141.0–269.5)*	61.9 (52.3–70)*	244.0 (105.0–381.0)*
ГР	0.0 (0–0)	29.6 (15.0–45.0)*	0.0 (0–0)	77.5 (40.0–94.7)	43.7 (32.7–57.7)	0.0 (0–0)
ГСТ	0.0 (0–2)	6.0 (2.0–10.2)	62.9 (2.0–75.0)*	18.2 (13.7–26.1)	20.3 (16.4–31.9)	74.0 (47.5–133.1)

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. * Отличие группы пренатально стрессированных крыс от группы контроля при $p < 0.05$.

тивность глутатионпероксидазы увеличивалась в 2 раза ($p = 0.005$), остальные ферменты не имели изменений в активности по сравнению с контрольными крысами. В митохондриях в отличие от фракции ядер активность глутатионпероксидазы снижалась в 4 раза по сравнению с контролем ($p = 0.005$), а глутатионредуктаза и глутатионтрансфераза не изменяли уровень активности по сравнению с показателями контрольных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные результаты показали, что в норме активность ферментов в субклеточных фракциях имеет более высокие значения в нейроглии по сравнению с нейронами (табл. 1). Исключение составляет активность глутатионпероксидазы в цитозоле, которая выше в нейронах. Такие результаты могут быть объяснены различием в структуре антиоксидантной защиты нейронов и нейроглии, а также непосредственным участием нейроглии в антиоксидантной защите нейронов [12]. В то же время собственная антиоксидантная защита нейронов, вероятно, обеспечивается

активностью глутатионпероксидазы в цитозоле. Кроме того, антиоксидантная защита функционирования ядра нейрона, возможно, обеспечивается внутриядерной активностью глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы с перекрывающимися свойствами [13]. Отсутствие активности исследованных ферментов в митохондриях нейронов может быть следствием активного митохондриального обмена с нейроглией [19]. В глиальных клетках следует отметить повышенную активность глутатионпероксидазы в митохондриях, что, вероятно, связано с интенсивным функционированием митохондрий в нейроглии [20].

Изменения активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии в результате воздействия пренатального стресса в виде схемы представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3 эти изменения свидетельствуют об усилении антиоксидантной защиты в ядре нейронов и нейроглии и митохондриях нейронов.

При сравнении исследованных показателей в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии пренатально стрессированных крыс, можно

Таблица 3. Изменение активности исследованных глутатионовых ферментов в нейронах и нейроглии у пренатально стрессированных крыс по сравнению с контрольной группой

Группа	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↓	↑	↑	↑	↑	↓
ГР	—	↑	—	—	—	—
ГСТ	—	—	↑	—	—	—

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” — снижение активности, “↑” — увеличение активности, “—” — отсутствие изменений.

предположить, что снижение активности глутатионпероксидазы цитозоля нейронов компенсируется повышением активности этого фермента в нейроглии. Значительное снижение глутатионпероксидазы митохондрий нейроглии по сравнению с контрольными животными может рассматриваться как неблагоприятное патологическое изменение в антиоксидантной защите нейроглии, связанное с нарушением энергетики этой клеточной популяции. В то же время это снижение активности глутатионпероксидазы митохондрий в нейроглии сопровождается повышением активности этого фермента в митохондриях нейронов, что может являться одним из компенсаторных механизмов последствий пренатального стресса.

Обращает на себя внимание повышение активности глутатионпероксидазы во фракции ядер нейроглиальных клеток. Следует отметить, что как в контроле, так и под воздействием пренатального стресса, активность исследованных ферментов во фракции ядер остается более высокой в нейроглиальных клетках. Это может рассматриваться как компенсаторные изменения, направленные на сохранение функции антиоксидантной защиты ядра, как в нейронах, так и в нейроглии.

Отсутствие изменений в показателях глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы нейроглии, возможно, связано с тем, что нарушения, вызванные пренатальным стрессом, по какой-то причине не затронули функцию этих ферментов.

Установленные факты иллюстрируют перспективность дальнейшего исследования роли антиоксидантных ферментов в процессе формирования системы нейрон–нейроглия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пренатальный стресс вызывает изменения в активности исследованных антиоксидантных ферментов в нейронах и нейроглии неокортекса, причем эти изменения различаются в

субклеточных фракциях этих клеточных популяций. Можно предположить, что результатом этих, зачастую разнонаправленных изменений, является устойчивость коры, как целого органа, к воздействию ПС (пренатальный стресс), несмотря на драматические процессы изменения дифференцировки в пренатальном онтогенезе. Изменения активности исследованных ферментов в субклеточной фракции ядер, по-видимому, можно считать защитной реакцией, направленной на поддержание сохранности генетического материала. Рост активности глутатионзависимых ферментов в митохондриях нейронов ПС животных и снижение в глиальных клетках может отражать увеличение метаболической активности в нейронах и снижение этой активности в нейроглии. Эти изменения могут носить как компенсаторный, так и патологический характер.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 гг. (ГП-14, раздел 65).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weinstock M.* // *Stress*. 2002. V. 5. № 3. P. 167–176.
2. *Weinstock M.* // *Brain, Behav. Immun.* 2005. V. 19. P. 296–308.
3. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.* Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: Деятка, 2007. 240 с.
4. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В.* // *Нейрохимия*. 2005. Т. 22. № 2. С. 102–107.
5. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А.* // *Нейрохимия*. 2012. Т. 29. № 2. С. 1–7.
6. *Geremia E., Baratta D., Zafarana S., Giordano R., Pinizotto M.R., La Rosa M.S., Garozzo A.* // *Neurochem. Res.* 1990. V. 15. P. 719–723.
7. *Khanna P., Nehru B.* // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2007. V. 27. P. 959–969.
8. *Pierozan P., Biasibetti H., Schmitz F., Avila H., Fernandes C.G., Pessoa-Pureur R., Wyse A.T.S.* // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 5752–5767.
9. *Savaskan N.E., Borchert A., Brauer A.U., Kuhn H.* // *Free Rad. Biol. & Med.* 2007. V. 43. P. 191–201.
10. *Fernandez-Fernandes S., Almeida A., Bolanos J.P.* // *Biochem. J.* 2012. V. 443. P. 3–12.
11. *Bolanos J.P.* // *J. Neurochemistry*. 2016. V. 139 (Suppl. № 2). P. 115–125.
12. *Baxter P.S., Hardingham G.E.* // *Free Rad. Biol. & Med.* 2016. V. 100. P. 147–152.
13. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* // *Усп. совр. биол.* 1990. Т. 110. № 1(4). С. 20–33.
14. *Ордян Н.Э., Пивина С.Г.* // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2003. Т. 84. № 1. С. 52–59.

15. Флеров М.А. // Вопр. мед. химии. 1978. Т. 24. № 2. С. 174–180.
16. Paglia D.E., Valentine W.N. // J. Lab. Clin. Med. 1967. V. 70. P. 158–169.
17. Carlberg I., Mannervik B. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 14. P. 5475–5480.
18. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 22. P. 7130–7139.
19. Rose J., Brian C., Woods J., Pappa A., Panayiotidis M.L., Powers R., Franco R. // Toxicology. 2017. V. 391. P. 109–115.
20. Kubik L.L., Philbert M.A. // Toxicol. Sci. 2015. V. 144(1). P. 7–16.

Influence of Prenatal Stress on the Activity of Antioxidant Enzymes in the Subcellular Fractions of the Neurons and Neuroglia of the Rat Neocortex

A. V. Vyushina^a, A. V. Pritvorova^a, O. G. Semenova^a, and N. E. Ordyan^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

We studied the effect of prenatal stress on the activity of glutathione-bound enzymes in the subcellular fractions of neurons and neuroglia of rat neocortex. Our results suggest that prenatal stress changes the activity of the studied enzymes in both neurons and neuroglia of the neocortex. These changes differed in the subcellular fractions of the studied cell populations. In the fraction of nuclei of neurons and neuroglia, the activity of glutathione peroxidase increased. In the cytosol of neurons, the activity of glutathione peroxidase decreased, while in the cytosol of neuroglia it increased. In the fraction of neuronal mitochondria, the activity of glutathione peroxidase and glutathione transferase increased, while in the fraction of neuroglial mitochondria, the activity of glutathione peroxidase decreased. It has been suggested that a change in the activity of the studied enzymes in the subcellular fractions of neurons and neuroglia is one of the causes of the resistance of the neocortex to the effects of prenatal stress.

Keywords: prenatal stress, glutathione peroxidase, glutathione transferase, glutathione reductase, neurons, neuroglia, subcellular fractions