УДК 612.015.1-017.2-018.2+577.112.386

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ И ГЛУТАТИОНОВОЙ РЕДОКС-СИСТЕМЫ ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ И ОХЛАЖДЕНИИ

Тапбергенов С.О., Бекбосынова Р.Б., Советов Б.С., Болысбекова С.М.
Государственный медицинский университет, Семей, e-mail: salavat-tap@mail.ru

В работе в сравнительном плане изучено состояние глутатиновой редокс-системы и глутатионредуктазы при перегревании и при охлаждении крыс, как экспериментальной модели стресса, при которой возможна индукция синтеза стрессорных белков – шаперонов. Перегревание вызывали путем содержания животных при температуре +40°С на протяжении 3-х часов. Охлаждение животных осуществляли путем содержания животных при температуре +5°С на протяжения 3-х часов. Проведенными исследованиями обнаружено, что при перегревании и при охлаждении организма животных имеет место практически однотипное изменение функционального состояния одного из компонентов системы стресс-белков – глутатионредуктазы. При перегревании и охлаждении в крови, в печени и в мозге активность глутатион редуктазы снижается. В крови при перегревании баланс в глутатионовой редокс – системе смещается в сторону восстановленных форм, при охлаждении в сторону окисленных форм. В печени при перегревании баланс в глутатионовой редокс – системе смещается в сторону окисленных форм, при охлаждении в сторону восстановленных форм. В головном мозге и при перегревании, и при охлаждении организма, баланс в глутатионовой редокс – системе смещается в сторону восстановленных форм. Анализ полученных результатов подтверждает представление о том, что стрессорная реакция организма сопровождается изменениями функционального состояния компонентов белков теплового шока и связанных с их функцией глутатиновой редокс-системы, необходимой не только для антиоксидантной защиты, но и для фолдинга белковых молекул.

Ключевые слова: шапероны, глутатионредуктаза, глутатионовая редокс-система, перегревание, охлаждение

FUNCTIONAL STATUS OF THE COMPONENTS OF HEAT SHOCK PROTEINS OF GLUTATHIONE REDUCTASE AND GLUTATHIONE REDOX SYSTEM BY OVERHEATING AND COOLING

Tapbergenov S.O., Bekbosynova R.B., Sovetov B.S., Bolysbekova S.M.
State Medical University, Semey, e-mail: salavat-tap@mail.ru

In this paper a comparative perspective was explored glutathione redox- system and glutathione reductase by overheating and cooling rats as an experimental model of stress, in which possible induction of stress proteins – chaperones.Overheating performed by the animals at + 40°C for 3 hours. Cooling animals was performed by the animals at + 5°C for 3 hours.Conducted research found that when overheating and cooling of animals takes place almost similar changes of the functional state of one of the components of stress proteins – glutathione reductase. If overheating and cooling in the blood, liver and brain glutathione reductase activity is reduced. In the blood by overheating glutathione redox balance – the system is shifted toward the reduced forms, in the cold side of oxidized forms.In the liver, when overheating of the glutathione redox balance – the system is shifted toward the oxidized form, while cooling toward reduced forms. In the brain, and overheating, the body, and with cooling, in the glutathione redox balance – the system is shifted toward the reduced forms. Analysis of the results confirms the idea that the body's stress response is accompanied by changes in the functional state of the components of heat shock proteins and their related function glutathione redox system needed not only for the antioxidant protection, but also for the folding of protein molecules.

Keywords: chaperones, glutathione reductase, glutathione redox- system, overheating, cooling

В 1974 году Тиссиерес и соавт. [2] впервые обнаружили, что в ответ на повышение температуры среды происходит активация синтеза специфической группы белков. Эта группа белков получила название белки теплового шока – шапероны (heat shock proteins, Hsp). Позже было установлено, что синтез этих белков индуцируется не только при повышении температуры, но и при многих других неблагоприятных стрессорных на организм воздействиях, а также под влиянием некоторых гормонов и ростовых факторов. В связи с этим белки теплового шока стали называть стресс-белками [6]. Было установлено, что в ответ на тепловой шок в клетках эукариот включается активация транскрипции всех генов, индуцируемых стрессом, осуществляемая специальным транскрипционным фактором (фактор теплового шока HSF). В клетках, не подвергшихся стрессу, HSF присутствует и в цитоплазме и в ядре в виде мономерной формы, связанной с шапероном Hsp70, и не имеет ДНК-связывающей активности.

В ответ на тепловой шок или другой стресс, Hsp70 отсоединяется от HSF и начинает укладывать денатурированные белки. HSF собирается в тримеры, у него появляется ДНК связывающая активность, он аккумулируется в ядре и связывается с промотором. При этом транскрипция шаперонов в клетке возрастает во много раз. После

того, как стресс прошел, освободившийся Hsp70 опять присоединяется к HSF, который при этом теряет ДНК-связывающую активность и все возвращается в нормальное состояние. Аналогичным образом все происходит и при других стрессах.

Согласно современной классификации, в основу которой положены различия в молекулярных массах, выделяют пять основных классов шаперонов (Hsp): Hsp100, 90, 70, 60 и малые Hsp (small Hsp, sHsp). Каждый из этих классов белков теплового шока выполняет характерные функции. Белки семейства Hsp60 могут участвовать в фолдинге сложно устроенных много доменных белков (таких как актин или тубулин), а также в АТР-зависимом исправлении ошибок в структуре частично денатурированных белков [8]. Hsp90 образуют сложный комплекс с шаперонами. Такой комплекс взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов, обеспечивает эффективное связывание гормона с рецепторами и последующий перенос гормон-рецепторного комплекса в ядро. Помимо этого, белки класса Hsp90 участвуют в направленном переносе нескольких типов протеинкиназ к участкам их функционирования [5].

К последней группе белков теплового шока относятся Hsp с малыми молекулярными массами (sHsp – small heat shock proteins) – малые белки теплового шока, выполняющие множество разных функций в клетке. По данным ряда авторов окислительный стресс сопровождается усиленным синтезом sHsp [9]. В настоящее время большая часть исследователей склоняется к заключению, что sHsp защищают клетку от окислительного шока, хотя в литературе высказывается и противоположная точка зрения. Установлено, что N-концевой домен sHsp состоит аминокислотных остатков богатый метионином. Для всех sHsp хлоропластов этот участок очень консервативен и, по всей видимости, участвует в распознавании субстратов [10]. Предполагают, что sHsp каким-то образом активируют или стабилизируют глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу – фермент, продуктом которого является NADPH [7]. NADPH используется глутатионредуктазой для поддержания нормального уровня восстановленной формы глутатиона, используемого глутатионпероксидазой для разрушения гидроперекисей. Все эти данные указывают на то, что функциональные эффекты шаперонов связаны с тиоловыми системами, через которые обеспечивается их антиоксидантное и другое действие.

Ранее нами была высказана гипотеза посттрансляционной трансформации нормальных клеточных прионов PrPC в аномальные PrPSc прионы [3]. Причиной появления PrPSc является не копирование конформации с ранее поврежденного приона, а связано с нарушением функции шаперонов контролирующих фолдинг полипетидных цепей нормальных прионов и сохранение их нативной структуры. В частности, аномальные PrPSc за счет гидрофобного взаимодействия с гидрофобными радикалами активного центра тиоредоксинредуктазы и глутатионредуктазы, ингибируют эффекты этих ферментов, необходимых для восстановления тиоредоксина и глутатиона. Эти тиоловые соединения необходимы для как для антиоксидантной защиты, так и для правильной укладки полипептидной цепи белковых молекул, а их недостаток блокирует функцию шаперонов, контролирующих формирование вторичной и третичной структуры нормальных клеточных прионов.

С учетом вышеуказанных позиций, о функциональной связи белков теплового шока с активностью тиоловых систем, нами была поставлена задача, в сравнительном плане изучить состояние глутатиновой редокс-системы и глутатионпероксидазы при перегревании и при охлаждении организма животных, как экспериментальной модели стресса, при которой возможна индукция синтеза стрессорных белков – шаперонов.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на беспородных белых крысах в возрасте 3-3.5 месяца массой тела 160-200 г. Перегревание вызывали путем содержания животных в тепловой вентилируемой камере при температуре +40°С на протяжении 3-х часов. Охлаждение животных осуществляли путем содержания животных в холодовой камере при температуре +5°С на протяжения 3-х часов. О состоянии глутатионой редокс-системы судили по количеству общего, окисленного (GSSG) и восстановленного глутатиона (GSH) которые определяли по Вудворду и Фрею в модификации М.С. Чулковой, описанной С.В. Травиной [4]. Активность НАДФН$_2$–зависимой глутатионредуктазы (ГР) определяли по методу С.Н.Власовой и соавтор [1]. Результаты исследования проанализированы при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 1, 2, 3 представлены данные об изменениях активности глутатион редуктазы и глутатионовой редокс-системы в крови, в печени и в головном мозге

при перегревании и охлаждении. Во всех тканях и при перегревании, и при охлаждении обнаружено снижение активности глутатионредуктазы. Однако состояние глутатионовой редокс-системы при перегревании и при охлаждении имеет отличие. При перегревании в крови, в печени и в головном мозге уровень общего глутатиона, окисленного и восстановленного глутатиона снижается. При охлаждении в крови уровень общего, окисленного и восстановленного глутатиона повышается (табл. 1).

в крови при перегревании преобладает процесс накопления восстановленной формы глутатиона, при соответствующем снижении уровня окисленного глутатиона и активности глутатионредуктазы.

При охлаждении в крови на фоне снижения активности глутатионпероксидазы и увеличения количества общего глутатиона, количества окисленного и восстановленного глутатиона, соотношение GSH /GSSG в сравнении с нормой снижается с 14.5 до 12.07 (табл. 1). Это говорит о том, что при охлаждении в крови

Таблица 1

Глутатионредуктаза и глутатионовая редокс-система в крови при перегревании и охлаждении (X±m)

Показатель	Контроль n=12	Перегревание n=12	Охлаждение n=12
Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН$_2$\г Нв в мин	5.8±0.34	3.6±0.22*	3.8±0.26
Общий глутатион (мкмоль/л)	1654.17±51.75	732.40±21.68*	1914.89±46.39*
Окисленный глутатион (GSSG) (мкмоль/л)	106.62±5.06	24.88±1.40*	146.52±13.96*
Восстановленный глутатион (GSH) (мкмоль/л)	1547.55±46.69	707.52±20.28*	1768.37±32.43*
Соотношение GSH /GSSG	14.5±0.09	28.88±0.18*	12.07±0.12*
Примечание. * – p<0.05 в сравнении с контролем.			

В печени и в мозге при охлаждении повышается уровень общего и восстановленного глутатиона, снижается уровень окисленного (табл. 2, 3). Что бы это всё значило? Для ответа на этот вопрос, основываясь на биологической функции тиолдисульфидной глутатионовой редокс – системе и её логической связи с ферментом глутатионредуктазой, мы в сравнительном плане решили рассчитывать соотношение уровней восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG). Величина этих соотношения (GSH /GSSG) представлена в таблицах 1,2,3.

В крови (табл. 1) при перегревании соотношение GSH /GSSG в сравнении с нормой увеличивается (с 14.5 до 28.88). Это значит, что животных преобладают процессы окисления глутатиона над его восстановлением в глутатионовой редокс-системе.

В печени (табл. 2) при перегревании на фоне сниженной активности глутатионпероксидазы и снижения всех форм глутатиона, снижается соотношение GSH/GSSG, что свидетельствует о преобладании процессов окисления над восстановлением. При охлаждении в печени на фоне сниженной активности глутатионпероксидазы и окисленной формы глутатиона, соотношение GSH / GSSG увеличивается. Это говорит о том, что в печени при охлаждении организма преобладает процесс восстановления глутатиона над его окислением.

Таблица 2

Глутатионредуктаза и глутатионовая редокс-система в печени при перегревании и охлаждении (X±m)

Показатель	Контроль n=12	Перегревание n=12	Охлаждение n=12
Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН$_2$\г Нв в мин	221.2±12.84	98.2±7.64*	186.2±9.88*
Общий глутатион (мкмоль/г)	8.99±0.25	6.32±0.28*	11.61±0.29*
Окисленный глутатион (GSSG) (мкмоль/г)	0.43±0.02	0.36±0.02*	0.37±0.02*
Восстановленный глутатион (GSH) (мкмоль/г)	8.56±0.23	5.96±0.26*	11.24±0.27*
Соотношение GSH /GSSG	19.90±0.10	16.55±0.05*	30.37±0.12*
Примечание. * – различия статистически значимы в сравнении с контролем p<0.05.			

В головном мозге и при перегревании и при охлаждении организма активность глутатионпероксидазы снижается (табл. 3). Но при этом в мозге при перегревании снижается уровень всех форм глутатиона (общего, окисленного и восстановленного). При охлаждении незначительно снижается количество только окисленного глутатион и увеличивается количество и общего, и восстановленного глутатиона (табл. 3).

В головном мозге при перегревании, и в большей степени при охлаждении организма баланс в глутатионовой редок-системе смещается в сторону восстановленных форм.

Таким образом, анализ полученных результатов подтверждает представление о том, что стрессорная реакция организма сопровождается изменениями функционального состояния компонентов белков теплового шока и связанных с их функцией

Таблица 3

Глутатионредуктаза и глутатионовая редокс–система в головном мозге при перегревании и охлаждении (X±m)

Показатель	Контроль n=12	Перегревание n=12	Охлаждение n=12
Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН2 \г Нв в мин	107.2±6.52	56.3±4.67*	58.8±5.50*
Общий глутатион (мкмоль/г)	5.20±0.10	3.42±0.11*	6.30±0.10*
Окисленный глутатион (GSSG) (мкмоль/г)	0.38±0.02	0.23±0.02*	0.27±0.06*
Восстановленный глутатион (GSH) (мкмоль/г)	4.82±0.08	3.19±0.09*	6.03±0.08*
Соотношение GSH /GSSG	12.68±0.09	13.86±0.11*	22.33±0.21
Примечание. * различия статистически значимы в сравнении с контролем p<0.05.			

Эти данные, а также увеличение соотношения GSH /GSSG и при охлаждении и при перегревании свидетельствует об усилении процессов восстановления глутатиона над его окислением в глутатионовой редокс-системе в головном мозге животных.

Заключение и выводы

Проведенными исследованиями обнаружено, что при перегревании и при охлаждении организма животных, как экспериментальной модели стресса, имеет место практически однотипное изменение функционального состояния одного из компонентов системы стресс-белков – глутатионредуктазы. Во всех тканях и при перегревании, и при охлаждении активность глутатионредуктазы снижается.

На фоне снижения активности глутатионредуктазы, изменения соотношения окисленной и восстановленной форм глутатиона (GSH /GSSG) глутатионовой редокс-системы специфично как относительно вида стресс фактора, так и относительно ткани:

В крови при перегревании баланс в глутатионовой редок-системе смещается в сторону восстановленных форм, при охлаждении в сторону окисленных форм.

В печени при перегревании баланс в глутатионовой редок-системе смещается в сторону окисленных форм, при охлаждении в сторону восстановленных форм.

глутатиновой редокс-системы, необходимой не только для антиоксидантной защиты, но и для фолдинга белковых молекул.

Список литературы

1. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С.19-22.

2. Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.В. Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биологической химии. – 2003. – т.43. – С.59-98.

3. Тапбергенов С.О., Тапбергенов Т.С. Гипотеза посттрансляционной трансформации нормальных клеточных прионов PrPC в аномальные PrPSc прионы // Успехи современного естествознания. 2009. – №4.– С. 61.

4. Травина С.В. Руководство по биохимическим исследованиям. – М.: Медгиз., 1955.– С.253-255.

5. Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohaszka Z., Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review // Pharmacol Ther. 1998. – Aug;79.– №2 – P.129-168.

6. Ellis R.J., Hemmingsen S.M. – Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures // Trends Biochem Sci. 1989. – Aug; 14(8) – P.339-342.

7. Mehlen P., Kretz–Remy C., Preville X., Arrigo A.P. – Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death // EMBO J. 1996.– Jun 3;15– №11 – P.2695-2706.

8. Netzer, W.J., Hartl, F.U. – Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms // Trends Biochem Sci. 1998. – Feb;23. – №2. – P.68-73.

9. Preville X., Salvemini F., Giraud S., Chaufour S., Paul C., Stepien G., Ursini M.V., Arrigo A.P.– Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery // Exp Cell Res. 1999 – Feb 25; – 247– №1. – P.61-78.

10. Waters E.R., Vierling E. Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein // Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 – Dec 7;96– №25. – P.14394-14399.