

ORIGINAL ARTICLE

ENZYMES OF ENERGY METABOLISM IN BRAIN AND CHRONIC
STRESS

Koshoridze N.I., Menabde K.O., Chachua M.V., Kuchukashvili Z.T., Chipashvili M.D.

*Faculty of Exact and Natural Sciences, Iv. Javakishvili Tbilisi State University. Georgia, 0128,
Tbilisi, Chavchavadze*

Tel.: (995 32) 34 80 48 (N. Koshoridze)

E-mail: tebr50@yahoo.com (M. Chachua)

Received February 26, 2009

The development of changes in the activity of creatinkinase, aldolase and succinatdehydrogenase in brain cells under 30-day long stress induced by isolation and violated diurnal cycle has been studied. It was shown that these enzymes heterogeneously responded to 30-day long stress. Particular sensitivity was recorded in the case of succinatedehydrogenase, which showed the decline of activity in various sections of the brain by 60-80% on average. Unlike succinatedehydrogenase, aldolase activity increased on the 10th day of stress and then declined. Similar results were observed in relation to phosphokinase activity.

Key words: stress/ aldolase/ creatinkinase/ succinatdehidrogenase.

ORIGINAL ARTICLE

ФЕРМЕНТЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ГОЛОВНОГО
МОЗГА И ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Кошоридзе Н.И., Менабде К.О., Чачуа М.В., Кучукашвили З.Т.,
Чипашвили М.Д.

Тбилисский Государственный Университет им. И Джавахишвили, Факультет точных
и естественных наук, Грузия, Тбилиси, 0128, Чавчавадзе 1

Tel.: (995 32) 34 80 48 (Кошоридзе Н.)-

E-mail tebr50@yahoo.com (Чачуа М.)

Поступила в редакцию 26 февраля, 2009

Изучена динамика изменения ферментативной активности креатинфосфокиназы, альдолазы и сукцинатдегидрогеназы головного мозга белых крыс при хроническом стрессе, вызванном 30-дневным нарушением циркадного ритма и изоляцией. Установлено, что исследуемые ферменты неоднородно реагируют на 30-дневный стресс. Особенную чувствительность проявляет сукцинатдегидрогеназа, активность которой в разных областях головного мозга после 10-дневного стресса уменьшается в среднем на 60-80%. В отличие от сукцинатдегидрогеназы, активность альдолазы на 10-ый день стресса возрастает, а уменьшение ферментативной активности наступает после 10-дневного хронического стресса. Аналогичные результаты обнаружены при исследовании креатинфосфокиназной активности.

Ключевые слова: стресс/альдолаза/креатинкиназа/сукцинатдегидрогеназа

Стресс - глобальная проблема, тесно связанная с процессами индустриализации и глобализации. Ответ организма на стресс возникает тогда, когда спрос к индивидууму превышает те персональные и социальные ресурсы, которые может мобилизовать индивид (Eysenck et al., 2000).

Исследования последних лет указывают на то, что хронический стресс оказывает сильное действие на биохимические показатели организма. Согласно литературным данным, в условиях стресса имеет место нарушение

функций клетки и возникновение таких заболеваний, как атеросклероз, амиотропный латеральный склероз, заболевание Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона и др. (Cernak et al., 2000; Youn et al., 2007). В основе этих заболеваний лежит нарушение процессов клеточного метаболизма. Для осуществления метаболических процессов, клетке необходима энергия, основным источником которой является АТФ. Постоянство количества АТФ особенно значимо для клеток, характеризующихся высокой энергетической потребностью, например

для клеток ЦНС. Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы является установление эффективности тех ферментативных систем, которые активно участвуют в процессе синтеза и генерации энергетических молекул, в частности, в процессах гликолиза и цикла Кребса, а также активности креатинфосфокиназы при хроническом стрессе.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на половозрелых белых лабораторных крысах мужского пола. Крысы содержались в индивидуальных вольерах и подвергались социальной изоляции в условиях темноты (соотношение темнота/свет 23,5/0,5 час). В указанных условиях животные находились в течение 30 дней. Контрольная группа состояла из животных, находящихся в общем вольере в естественных условиях (10,00/14,00 час). В ходе эксперимента животные, усыпленные хлороформом, подвергались декапитации с целью извлечения мозга. Митохондриальные и цитозольные фракции получали дифференциальным центрифугированием в градиенте сахарозы (De Robertis, 1969).

Креатинкиназа катализирует реакцию превращения креатина в фосфокреатин. Полученные фосфаты определяются спектрофотометрически в виде фосфованадий-молибденового комплекса. Инкубационная смесь содержала исследуемую суспензию (0,1 мл) и 0,5 мл раствора креатина (1,9мМ), приготовленный на глициновом буфере (рН-9,7). В смесь добавляли АТФ (0,07мМ) и инкубировали в течение 60 мин. при 37°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением трихлоруксусной (ТХУ) кислоты (14%) и центрифугировали при 3000g. В супернатант добавляли смесь аммония ванадата и аммония

молибдата (1:1), после чего интенсивность синей окраски измеряли спектрофотометрически при $\lambda=400\text{нм}$ (Ueda et al., 1970).

В митохондриях сукцинатдегидрогеназную активность определяли колориметрически посредством 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразольного бромида (МТТ) и синего формазана. Митохондрии промывали дважды инкубационным раствором, приготовленным на буфере НЕРЕС (140 мМ NaCl, 5мМ KCl, 5мМ NaHCO₃, 1,1мМ MgCl₂, 5,5мМ глюкозы и 20мМ НЕРЕС, рН-7,4) и инкубировали в течение 45 мин при 37°C в инкубационном растворе, содержащем МТТ (0,5мг/мл) и 3мМ сукцинат, после чего раствор отделяли, а продукт синего формазана растворяли в 0,3мл 100%-ном диметилсульфоксиде. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при $\lambda=540\text{нм}$ (Abe et al., 1974).

Метод определения альдолазной активности основан на определении концентрации щелочнолабильного фосфора триозофосфатов. Инкубационная смесь содержала 1мл глициновый буфер (0,1М, рН- 9,0), 0,25мл раствора фруктозо-1,6-дифосфата (2мМ) и 0,25мл раствора гидразина (0,1М). В инкубационную смесь добавляли 20мкл исследуемого раствора и проводили инкубацию в течение 3 мин. при 37°C, после чего реакцию останавливали 2М NaOH. Пробы оставляли на 20 мин. при комнатной температуре и определяли содержания неорганического фосфора. Измерение активности фермента проводили спектрофотометрически при $\lambda=340\text{нм}$ (Chappel. et al., 1974).

Белок определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Полученные данные обрабатывали по Стьюденту.

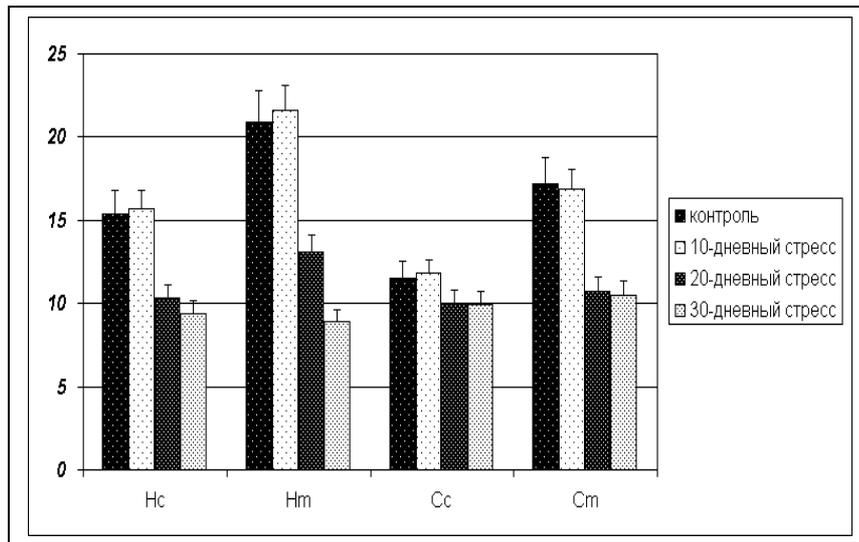


Рис. 1. Динамика изменения креатинфосфокиназной активности головного мозга белых крыс при хроническом стрессе

На оси ординат- креатинфосфокиназная активность, выраженная $\mu\text{моль } P_i/\text{мг белок}^{-1}\text{мин}^{-1}$.

Hc –цитозольная фракция гиппокампа, **Hm** –митохондриальная фракция гиппокампа

Cc - цитозольная фракция коры больших полушарии, **Cm** – митохондриальная фракция коры больших полушарии.

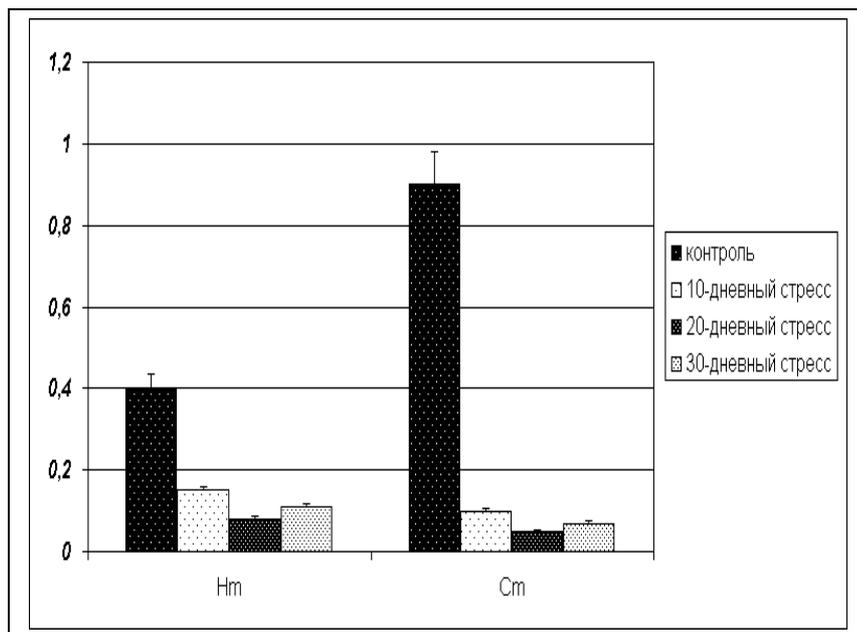


Рис. 2. Динамика изменения сукцинатдегидрогеназной активности головного мозга белых крыс при хроническом стрессе

На оси ординат- Изменение оптической плотности при $\lambda=540\text{нм}$

Hm – митохондриальная фракция гиппокампа, **Cm** - митохондриальная фракция коры больших полушарии.

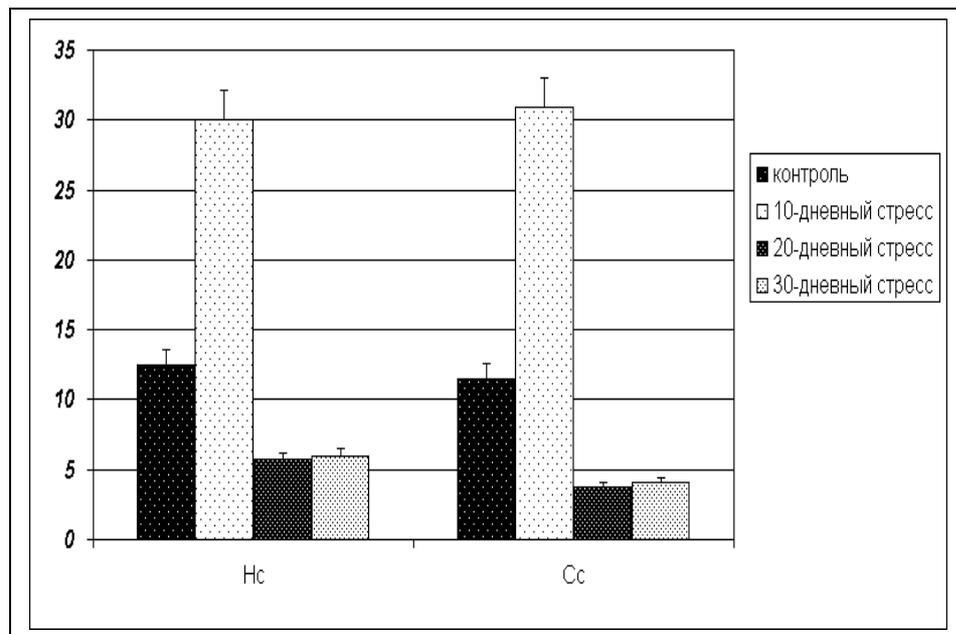


Рис. 3. Изменение альдолазной активности головного мозга белых крыс при хроническом стрессе

На оси ординат- количество щелочнолабильного фосфора триозофосфатов, выраженная $\mu\text{моль P}_i/\text{мг белок}^{-1}\text{мин}^{-1}$.

Hc –цитозольная фракция гиппокампа, **Cc** - цитозольная фракция коры больших полушарий.

Результаты и обсуждение

Известно, что формирование хронического стресса под воздействием различных факторов происходит ступенчато и проявляется в изменении физиологических и биохимических параметров. Исходя из этого, было изучено изменение ферментативной активности в результате 10-, 20- и 30-дневного стресса (рис.1). Выяснилось, что 10-дневный стресс не влияет на активность СК. Как видно из рисунка, снижение ферментативной активности наблюдается после 10-дневного стресса, в частности при 20-дневном стрессовом периоде. По сравнению с контролем, ферментативная активность митохондриальной и цитозольной изоформ уменьшается на 20-25%. Исключение составляет цитозоль коры больших полушарий, где СК активность по сравнению с показателем 10-дневного стресса,

характеризуется незначительным уменьшением. Что касается ферментативной активности при 30-дневном стрессе, то эти показатели по сравнению с 20-дневным стрессом, почти не изменяются. Исключение составляет митохондриальная фракция гиппокампа, где отмечается приблизительно 15%-ное снижение ферментативной активности.

Известно, что активность СК сопряжена с процессом окислительного фосфорилирования и предположительно ферментативная активность пропорциональна интенсивности митохондриальных процессов. Исходя из вышесказанного, была изучена активность сукцинатдегидрогеназы – фермента цикла Кребса в коре головного мозга и гиппокампе в условиях хронического стресса. Выяснилось, что активность фермента как в гиппокампе, так и в

коре головного мозга белых крыс, по сравнению с контролем, уменьшается (рис.2). Необходимо отметить, что высокой ферментативной активностью характеризуется кора больших полушарий, а 10-дневный хронический стресс уменьшает активность фермента приблизительно на 70% (рис.2). При 30-дневном стрессе также наблюдается снижение ферментативной активности.

Известно, что в снабжении клетки АТФ, кроме окислительного фосфорилирования, имеет место также цитозольный, анаэробный процесс – гликолиз. Исходя из этого, представился интерес к выяснению интенсивности гликолиза во время хронического стресса. Этот процесс был изучен на примере активности фермента альдолазы. Полученные результаты представлены на рисунке 3. Из данных следует, в условиях 10-дневного хронического стресса, резко повышается альдолазная активность (приблизительно на 200%), после чего активность, по сравнению с 10-дневным стрессом также резко уменьшается (90%). Полученные данные указывают на предельное снижение интенсивности процесса гликолиза.

Как видно из представленных данных, во время 30-дневного хронического стресса, вызванного нарушением циркадального ритма и изоляцией, имеет место снижение как креатинфосфокиназной активности, так и самого процесса синтеза АТФ, что влияет на количество энергетически богатых соединений. В этом процессе особенную чувствительность проявляет гиппокамп. Как известно, гиппокамп представляет собой область головного мозга, ответственную за такие важные процессы, как формирование эмоций у животных, обучение и память. Предположительно, нарушение энергетического баланса в условиях хронического стресса, отрицательно влияет на данные процессы.

Литература

- Abe K., Matsuki A. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and LDH release using MTT. (1974) *J.Neurosci. Res.*, **38**, 325-329.
- Cernak I., Savic V., Kotur J., Prokic V., Kuljic B., Grbovic D., Veljovic M. Alterations in magnesium and oxidative status during chronic emotional stress. (2000) *Dev. of Research on Magnesium*, **13**, 29-36.
- Chappel A., Hoogenraad N.J., Holmts R.S. Purification and properties of the native form of rabbit liver aldolase. (1975) *Biochem. J.*, **175**, 377-384.
- De Robertis E. Structural components of the synaptic region. (1967) *Handbook of Neurochem.*, **2**, 365-372.
- Eysenck M.W., Keane M.T. *Cognitive Psychology: A Student's Handbook* (4th Ed.) (2000) Philadelphia: Psychology Press.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Ueda I., Wada T. Determination of inorganic phosphate by the molybdovanadate method in the presence of ATP and some interfering organic bases. (1970) *Anal. Biochem*, **37**, 169-174.
- Youn H., Ji I., Ji HP., Markesbery W. R., Ji T.H. Under-expression of Kalirin-7 Increases iNOS Activity in Cultured Cells and Correlates to Elevated iNOS Activity in Alzheimer's Disease Hippocampus. (2007) *J. Alzheimers Dis.*, **12**, 271-281.