

СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, МОДЕЛИРУЮЩЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

© 2018 г. Г.Ф. Иваненко, Н.В. Бобкова*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: galiv@sky.chph.ras.ru, nbobkova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.01.16 г.

После доработки 08.12.17 г.

Проведено исследование глутатиона в плазме крови у мышей линии NMR1 при развитии патологии, моделирующей нейродегенерацию удалением обонятельных луковиц (бульбэктомией) в сравнении с ложноперирированными (без удаления обонятельных луковиц), и контрольными животными (до операции). Через месяц после операции обнаружено двукратное увеличение восстановленного, окисленного глутатиона и повышение тиолдисульфидного отношения в плазме крови бульбэктомированных мышей относительно ложноперирированных. В сроки от трех до двенадцати месяцев наблюдается снижение тиолдисульфидного отношения в результате истощения восстановленного и накопления окисленного глутатиона в плазме крови животных, что служит признаком патологического процесса. Основные нарушения, связанные с окислительным стрессом, обнаружены в сроки максимального проявления болезни. В этот период наблюдается существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар, таких как восстановленный глутатион/дисульфид глутатиона.

Ключевые слова: восстановленный и окисленный глутатион, плазма крови, окислительный стресс, экспериментальная патология, моделирующая болезнь Альцгеймера.

Окислительный стресс, вызванный химическими, физическими или биологическими агентами, стимулирует образование реакционных форм кислорода в клетках и ответную реакцию клеток в виде сигналов к сохранению редокс-равновесия. Важная роль в этой реакции принадлежит соединениям, содержащим SH-группы, в том числе и глутатионзависимым ферментам. Глутатион (GSH) является жизненно необходимой составной частью клеток организма, действует как редокс-буфер и кофактор для сигнальной трансдукции, участвует в антиоксидантной и электрофильной защите, особенно в мозге. Смешанные дисульфиды, включенные между белками и глутатионом (глутатионирование белка), присутствуют в клетках в высоких концентрациях, выполняют важную роль в механизме поддержания буферной окислительно-восстановительной системы «SH/SS–глутатион», антиоксидантной активности и модуляции

специфической активности белков, в частности ферментов [1,2].

Большинство реакционных форм кислорода постоянно образуются в клетке, но их уровень в норме настолько небольшой, что клетка либо инактивирует их с помощью антиоксидантной системы, либо заменяет поврежденные молекулы. Возможно, что тип ответной реакции адаптационного механизма на стресс – активация или угнетение функции – зависит от силы и продолжительности воздействия [3].

Головной мозг чрезвычайно уязвим к окислительному повреждению. Чрезмерная генерация реакционных форм кислорода приводит к окислительному стрессу, вызывающему нарушение гомеостаза глутатиона и снижению активности глутатионзависимых ферментов, инициируя развитие нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [4].

Характерным признаком болезни Альцгеймера является деградация белков и образование белковых амилоидных агрегатов, вызывающих гибель нейронов в специфических областях [5].

Сокращения: GSH – глутатион, GSSG – окисленный глутатион.

Разработан подход к созданию модели спорадической формы болезни Альцгеймера. Для инициации распространяющегося процесса дегенерации в специфических структурах мозга использовано удаление обонятельных луковиц (бульбэктомия). Моделирование нейродегенерации бульбэктомией приводит к развитию нейродегенеративного процесса, который по своим поведенческим, морфологическим и биохимическим признакам сходен с проявлениями болезни Альцгеймера у человека, включая нарушение пространственной памяти и накопление в мозге β -амилоидного пептида [6].

Целью наших исследований явилось изучение возможных изменений системы глутатиона в плазме крови у мышей линии NMR1 при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа, в разные сроки: от двух недель до двенадцати месяцев после операции в сравнении с ложной операцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты по бульбэктомии были проведены на мышах-самках и самцах линии NMR1 [7]. Мышей ($n = 24$) наркотизировали гексеналом (40 мг/кг). Двустороннее удаление обонятельных луковиц у самок ($n = 10$) и самцов ($n = 5$) проводили путем аспирации через трепанационное отверстие. Контролем служили ложноперирированные животные (самки, $n = 9$), которые подвергались аналогичной процедуре, но без удаления обонятельных структур. Всем животным по окончании операции в мышцы задней лапки вводили антибиотик для профилактики развития инфекции [6].

Кровь (0,2 мл) брали индивидуально у каждого животного до и через 14 суток, 1, 2, 3, 6, 8 и 12 месяцев после ложной операции и бульбэктомии.

В плазме крови мышей определяли содержание восстановленного и окисленного глутатиона методом, описанным в нашей ранней публикации [8].

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Sigma Plot версии 8.0. Результаты выражали как среднее значение с ошибкой репрезентативности ($M \pm m$), для оценки достоверности различий использовали t -критерий Стьюдента для парных переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучено содержание сульфгидрильных и дисульфидных групп глутатиона и со-

ответственно изменение величины тиолдисульфидного отношения в плазме крови у бульбэктомированных мышей (самок и самцов) при развитии патологического процесса, имитирующего деменцию альцгеймеровского типа, у ложноперирированных и контрольных (до операции) животных в период от двух недель до одного года. Из полученных результатов, представленных на рис. 1, очевидны различия в содержании глутатиона, выраженные в разной степени при развитии заболевания. Уровень GSH в плазме у ложноперирированных животных практически не меняется в течение всего периода исследования и совпадает с показателями контрольных животных. У бульбэктомированных мышей, напротив, в ранние сроки после операции (две недели) уровень GSH в плазме достоверно превышает контрольные значения, однако с развитием патологии его содержание снижается. Наблюдается отрицательная корреляционная зависимость между уровнем GSH в плазме крови и инициацией нейродегенеративного процесса у мышей-самок ($r = -0,76$, $P = 0,01$) и самцов ($r = -0,47$, $P = 0,05$) при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа (рис. 1а).

Содержание окисленного глутатиона (GSSG) в плазме крови через один, два и три месяца после ложной операции соответственно в два, три и четыре раза превышает значения, характерные для контрольных животных. Через шесть месяцев у ложноперирированных животных уровень GSSG снижается практически до контрольных значений (рис. 1б). Через 0,5–3 месяца после бульбэктомии уровень глутатиона дисульфида в плазме крови у животных (самок и самцов) увеличивается в полтора–два раза, а затем снижается практически в те же сроки, что и у ложноперирированных животных. Однако масштаб изменений содержания GSSG в плазме у бульбэктомированных мышей существенно ниже, чем у ложноперирированных (рис. 1б). По-видимому, окислительный стресс, вызванный ложной операцией у мышей, не является критическим, так как наблюдается сохранение оптимального окислительно-восстановительного соотношения, регулирующего механизмы антиоксидантной защиты. Кроме того, одной из важных биологических функций тиолдисульфидной системы является адаптация организма к окислительному стрессу, вызванному внешними воздействиями.

Повышение концентрации окисленного глутатиона у ложноперирированных животных происходит либо за счет реализации клетками его избытка для поддержания внутриклеточного отношения глутатион/дисульфид глутатиона, либо

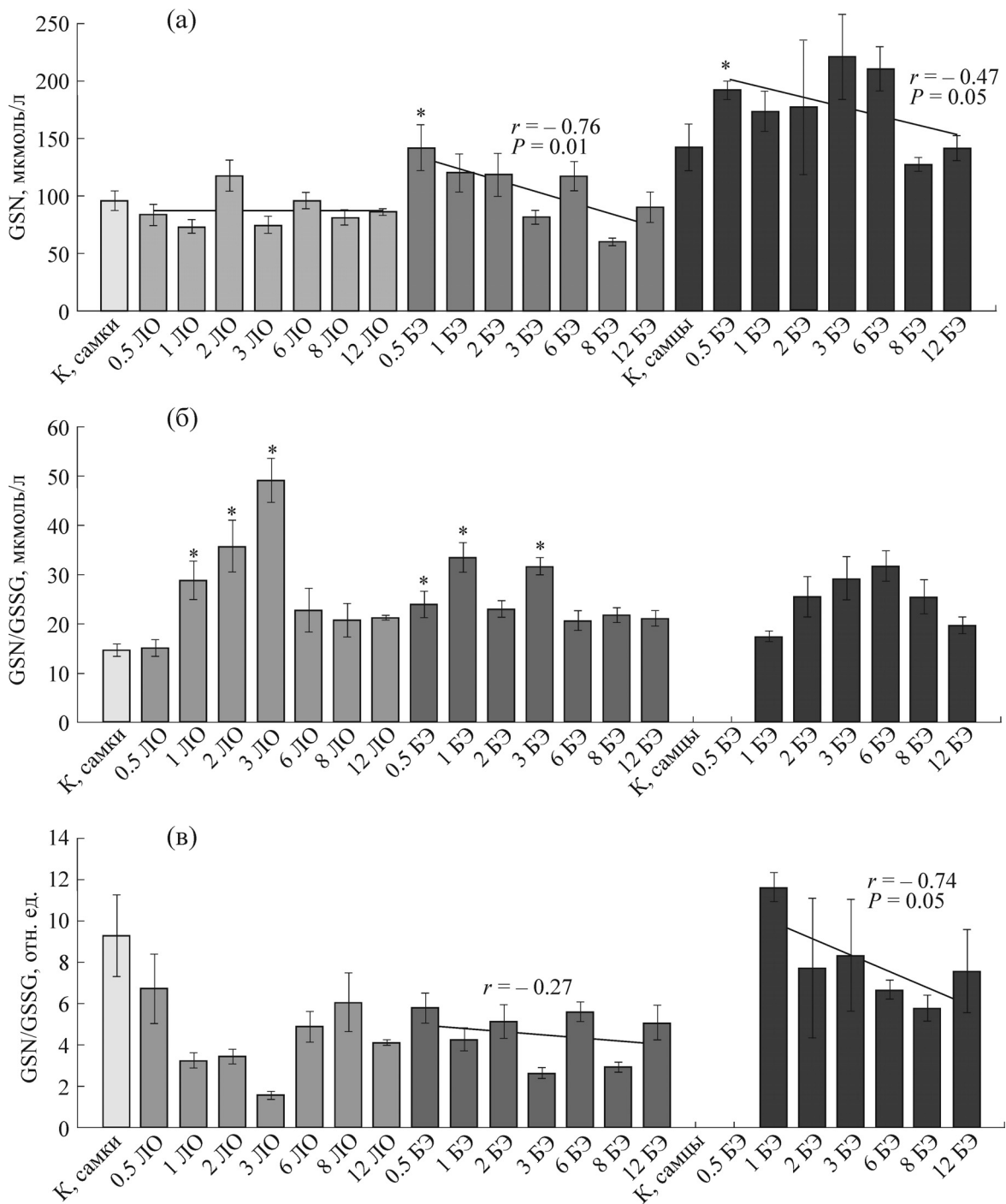


Рис. 1. Изменение содержания GSH (а), GSSG (б) и величины тиолдисульфидного отношения (GSH/GSSG) (в) в плазме крови у мышей линии NMR1 (самок и самцов) до операции (контроль) и после операции (ЛЮ – ложнооперированные и БЭ – бульбэктомированные животные) в разные сроки (в месяцах, обозначено числами). *Различия между группами считали статистически значимыми в сравнении с контрольной группой при $P \leq 0,05$.

для увеличения синтеза GSH *de novo* [9]. В ходе реакции катализируемой GSH-пероксидазой увеличение продукции GSSG может привести к образованию смешанных дисульфидов «белок–глутатион» (глутатионирование белка), что

является важным этапом механизма редокс-регуляции при физиологических условиях [10]. Таким путем достигается возможность защиты белка от необратимого окисления. Вероятно, поэтому мы и не обнаружили изменений GSH

в плазме крови у ложнооперированных мышей (рис. 1а), но наблюдали увеличение содержания GSSG в ранние сроки после операции (рис. 1б).

Следует отметить, что у ложнооперированных животных снижение величины GSH/GSSG в два–четыре раза наблюдается в период от двух до трех месяцев. В более поздние сроки после операции (шесть–двенадцать месяцев) тиолдисульфидное отношение повышается, практически достигая контрольных значений (рис. 1в). При бульбэктомии у мышей-самок и мышей-самцов тиолдисульфидное отношение снижается в период от двух недель до двенадцати месяцев. Однако наиболее выраженное снижение тиолдисульфидного отношения при развитии экспериментальной патологии наблюдается у самцов ($r = -0,74$, $P = 0,05$). Это является важным индикатором окислительного или «дисульфидного» стресса (рис. 1в).

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Однако риски развития на ранних стадиях заболевания мало изучены. Результаты проведенного нами исследования показали, что моделирование нейродегенерации удалением обонятельных луковиц (бульбэктомия) приводит к нарушению тиолдисульфидной системы в плазме крови у мышей при развитии патологии. В ранние сроки после бульбэктомии наблюдается сверхактивация антиоксидантной защиты, которая расходуется в более поздний период развития заболевания у животного.

Для большей наглядности на рис. 2 показаны относительные изменения параметров глутатиона в разные сроки развития заболевания: после бульбэктомии. Начальное проявление болезни приходится на ранний срок (две недели) после бульбэктомии, а через двенадцать месяцев проявляются признаки, сходные с признаками болезни Альцгеймера [11]. Относительное содержание глутатиона (GSH, GSSG, GSH/GSSG) в плазме крови представлено в виде отношения показателей бульбэктомированных мышей-самок к показателям, полученным для ложнооперируемых животных. Как видно из рис. 2, стадийность изменений более наглядно просматривается, когда результаты представлены в относительных единицах. Кроме того, видно существенное изменение содержания глутатиона в опыте по сравнению с контролем уже через две недели после операции. Максимальное увеличение содержания GSH и GSSG в плазме крови у мышей наблюдается на ранней стадии (один месяц) развития экспериментальной патологии. У бульбэктомированных животных, у которых моделируется нейродегенерация альцгеймеровского типа, его уровень повышается

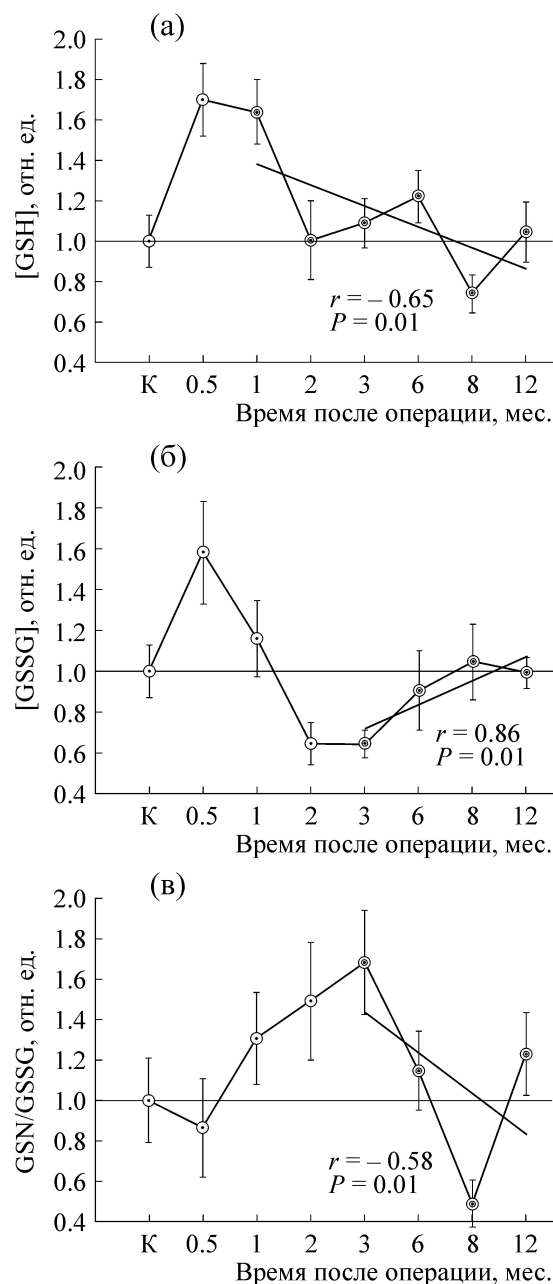


Рис. 2. Изменение содержания GSH (а) и GSSG (б) и величины тиолдисульфидного отношения GSH/GSSG (в) в плазме крови у мышей до операции (контроль) и после операции в разные периоды развития заболевания от 0,5 до 12 месяцев. Данные представлены в относительных единицах (отношение уровня глутатиона у бульбэктомированных мышей к ложнооперированным).

более чем в полтора раза по сравнению с интактными мышами (до операции) (рис. 2а,б).

Через один месяц происходит снижение содержания GSH и GSSG в плазме крови у мышей (рис. 2а,б). Уровень восстановленного глутатиона снижается практически до контрольных

значений и остается почти неизменным на дальнейших сроках развития заболевания (рис. 2а). Содержание GSSG падает до минимальных значений через один месяц. Наиболее низкий его уровень (в два раза ниже, чем в контроле) наблюдается в период между двумя–тремя месяцами (рис. 2б). При этом величина тиолдисульфидного отношения повышается относительно контрольных показателей (до операции) (рис. 2в). Максимальное повышение тиолодисульфидного отношения (до 1,6 отн. ед.) наблюдается в период между двумя–тремя месяцами, когда уровень GSSG в плазме крови у мышей самый низкий (рис. 2б,в).

В отдаленные сроки после бульбэктомии (от трех до двенадцати месяцев) изменение соотношения между уровнем GSH и GSSG в плазме крови у мышей отражается на величине тиолдисульфидного отношения. На фоне развития экспериментальной патологии у мышей окисление восстановленного глутатиона в плазме крови приводит к увеличению содержания GSSG (маркера окислительного стресса) и уменьшению величины тиолдисульфидного отношения (рис. 1).

Содержания глутатиона коррелирует с развитием патологии у мышей, моделирующей нейродегенерацию при удалении обонятельных луковиц в период от трех месяцев до одного года после операции. Между содержанием GSH, тиолдисульфидным отношением в плазме крови мышей и развитием заболевания наблюдается отрицательная зависимость (рис. 2). В сроки максимального проявления болезни (период нарушения пространственной памяти) наблюдаются максимальные изменения регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза (разбалансировка антиоксидантной защиты).

Следует отметить, что начальное проявление болезни приходится на ранний срок (12 суток). По оценке соответствующих физиологических и морфологическим показателей в течение одного месяца патологические процессы проявляются максимально. Срок в пять месяцев после бульбэктомии соответствует стадии компенсации, когда эти показатели возвращаются к нормальному уровню, в дальнейшем с увеличением возраста снова проявляются признаки, сходные с признаками болезни Альцгеймера [12].

У мышей линии NMR1 при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа, проведена оценка различий в системе глутатиона в абсолютных (рис. 1) и в относительных единицах (рис. 2). Полученные нами экспериментальные данные позволили обнаружить из-

менения окислительно-восстановительного состояния системы глутатиона в плазме крови мышей в ходе заболевания. Наиболее вероятным объяснением ранних событий, происходящих у животных при развитии экспериментальной патологии, является непродолжительное парадоксальное увеличение уровня глутатиона. Когда редокс-система становится нерегулируемой, появляется дисбаланс, при котором антиоксидантная защита превосходит образование окислителей. Это связывают с редуцивным стрессом, характеризующимся аномально высоким уровнем восстановительных компонентов внутри биологических систем [13]. Редуцивный стресс обнаружили и у животных с экспериментальной патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера, когда их редокс-статус определяли в молодом возрасте, то есть до начала процесса заболевания. Редуцивный стресс связывают с нарушением гомеостаза глутатиона (увеличение уровня GSH и GSH/GSSG) и увеличением агрегации белков в экспериментах на мышцах [14].

Продолжающийся в течение длительного времени редуцивный стресс может привести к изменению другого самого отдаленного редокс-баланса, т.е. к окислительному стрессу, индуцируя сигнальные нарушения в клетках. В то время как окислительный стресс является характерным для поздней стадии болезни Альцгеймера, редуцивный стресс происходит на ранних этапах заболевания. В период до проявления болезни редуцивный стресс увеличивает риск дальнейшего развития деменции альцгеймеровского типа [15].

У индивидов со слабо выраженными когнитивными нарушениями до заболевания, но с высоким риском развития болезни Альцгеймера (носители аллеля ApoE 4), длительное время подвергавшихся редуцивному стрессу, повышена экспрессия фермента глутатионпероксидазы (катализирующего восстановление GSSG) [16].

Основные нарушения окислительно-восстановительного состояния тиолдисульфидной системы при развитии экспериментальной патологии (бульбэктомии) у животных, можно рассматривать как следствие окислительного стресса, инициирующего развитие нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами исследования показали, что на ранних стадиях у животных при развитии экспериментальной патоло-

гии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа, наблюдается сверхактивация антиоксидантной защиты, которая расходуется в более поздний период жизни. При бульбэктомии уже через две недели после операции увеличивается концентрация глутатиона (GSH, GSSG) выше физиологической нормы. Очевидно, повышенный уровень GSH в плазме крови у бульбэктомированных животных можно рассматривать как проявление компенсаторной реакции в виде активации метаболизма глутатиона в ответ на развитие редуцирующего стресса. В сроки максимального проявления болезни наблюдается нарушение регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза (разбалансировка антиоксидантной защиты). Полученные результаты позволяют понять суть не только ранних событий в ходе заболевания, но и при максимальном проявлении болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Gilbert, *Methods in Enzymology* **251**, 8 (1995).
2. E. M. Allen and J. J. Mielay, *Antioxid. Redox Signal.* **17** (12), 1748 (2012).
3. В. В. Соколовский, *Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды* (СПб.: Наука, 2008).
4. M. C. Badia, E. Giraldo, D. Alonso, et al., *Free Radical Biol. Med.* **63**, 274 (2013).
5. T. Nakamura and S. A. Lipton, *Apoptosis* **14**, 455 (2009).
6. Н. В. Бобкова, И. В. Нестерова и В. В. Нестеров, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **131** (5), 507 (2001).
7. E. Bomhard and U. Mohr, *Exp. Pathol.* **36**, 129 (1989).
8. Г. Ф. Иваненко и Е. Б. Бурлакова, *Изв. РАН. Сер. биологическая*, № 1, 9 (2005).
9. S. C. Lu, *Curr. Top. Cell Regul.* **36**, 95 (2000).
10. P. Ghezzi, V. Bonneto, and M. Fratelli, *Antioxid. Redox Signal.* **7** (7–8), 964 (2005).
11. Н. В. Бобкова, И. В. Нестерова, Н. И. Медвинская и др., в сб. *Тез. конф. «Фундаментальные науки-медицине»* (2002), с. 39.
12. О. М. Вольпина, Т. Д. Волкова, Н. И. Медвинская и др., *Биоорган. химия* **41** (2), 145 (2015).
13. M. Kemp, Y. M. Go, and D. P. Jones, *Free Radical Biol. Med.* **44**, 921 (2008).
14. X. Zhang, X. Min, C. Li, et al., *Hypertension* **55** (6), 1412 (2010).
15. H. Zhang, P. Limphong, J. Pieper, et al., *FASEB J.* **26**, 1442 (2012).
16. A. Lloret, T. Fuchsberger, E. Giraldo, and J. Viña, *Curr. Alzheimer Res.* **13** (2), 206 (2016).

State of Glutathione in Animal Blood Plasma in the Development of Experimental Neurogenerative Pathological Processes Underlying Alzheimer Disease

G.F. Ivanenko and N.V. Bobkova*

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

A state of glutathione in blood plasma was investigated in the development of experimental neurogenerative pathological processes underlying Alzheimer diseases triggered by removal of the olfactory bulbs (bulbectomy) in NMR1 mice model experiments and compared to that in sham-operated (not subjected to removal of the olfactory bulbs) and control animals (prior to surgery). A month after surgery a two-fold increase in levels of reduced, oxidized glutathione was observed and the thiol-disulfide ratio in blood plasma of bulbectomized mice was higher relative to sham-operated mice. Over the course of 3 to 12 months a decrease in the thiol-disulfide ratio is observed as a consequence of depletion of reduced glutathione and accumulation of oxidized glutathione in animal blood plasma which is the trait of the development of the pathological process. The major disorders caused by oxidative stress are revealed in the late stage of the disease. During this period, there is a significant decline in the reducing capacity of the redox couples, such as reduced glutathione/glutathione disulfide.

Keywords: reduced/oxidized glutathione, blood plasma, oxidative stress, Alzheimer-like pathology in model experiments