

Биолог. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 577.152.273:577.151.64:577.15.04

ВВ-ИЗОФЕРМЕНТ КРЕАТИНКИНАЗЫ – БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ПРОМЫШЛЕННЫМ ЯДОМ УКРИНОЛ

**Լ.Տ. ՆԵՐՏԵՏՈՎԱ, Մ.Գ. ԳԱԶԱՐՅԱՆ, Դ.Օ. ՄԵԼԻԿՏԵՅԱՆ, Յ.Տ. ՄԿՐՏՇՅԱՆ,
Տ.Ա. ՄԿՐՏՇՅԱՆ, Ա.Տ. ԿԱԶԱՐՅԱՆ, Զ.Ի. ԱԿՕՅԱՆ**

Институт молекулярной биологии НАН РА, 375014, Ереван

Хроническая интоксикация промышленным ядом укринол вызывает в мозге и печени крыс бифазные изменения активности креатинкиназы без изменения ее изоферментного состава: к концу срока интоксикации определяется повышение активности фермента на 20-40% над контрольным уровнем. В то же время в сыворотке крови обнаруживается увеличение доли ВВ-изофермента креатинкиназы и появление МВ-изофермента, что, по-видимому, связано с увеличением проницаемости клеток мозга и печени, являющихся мишенями действия укринола, а в сыворотке крови рабочих, имеющих стаж работы в фольгопрокатном цехе не менее 5 лет увеличивается доля активности МВ-изофермента и появляется ВВ-изофермент, что может служить тестом для определения токсического влияния укринола.

Ուկրինոլով քրոնիկ թունավորումը առաջացնում է առնետների ուղեղի և լյարդի կրեատինկինազայի ակտիվության բիֆազ փոփոխություններ, առանց որևէ փոփոխությունների իրենց իզոֆերմենտային սպեկտրում, որը արդյունքում բերում է 20-40%-ով ֆերմենտի ակտիվության մեծացմանը: Սինդրոմ ժամանակ առնետների արյան շիճուկում նկատվում է կրեատինկինազայի ВВ-իզոֆերմենտի ակտիվության բաժնի ավելացում և МВ-իզոֆերմենտի ակտիվության ցուցաբերում, որը կարող է կապված լինել ուղեղի և լյարդի բջջային մեմբրանների թափանցելիության մեծացման հետ, այն է МВ- և ВВ- իզոֆերմենտների ակտիվության բաժնի ավելացում, նկատվում են ուկրինոլ սպարող ալյունին փայլաթիթեղների արտադրությունում 5 տարուց ավելի աշխատող բանվորների արյան շիճուկում: Վեջինս կարող է օգտագործվել որպես մարդու օրգանիզմի ուկրինոլով ինտոկսիկացիայի կենսաքիմիական ցուցանիշ:

Chronic ukrinol intoxication causes biphasic response in creatine kinase activity in rat brain and liver (final 20-40% increase), with no changes of isoenzyme spectrum. At the same time, an increase in the activity share of creatine kinase BB-isoenzyme, as well as addition of creatine kinase MB-isoenzyme activity in the serum of these rats has been detected. These changes in the serum may be due to increased permeability of damaged rat brain and liver cell membranes. Similar alterations in creatine kinase isoenzyme spectrum have been observed in the serum of foil-rolling plant workers who have been impacted by ukrinol during more than five years of industrial experience. In this case alterations included increase in the activity share of MB-isoenzyme, as well as addition of creatine kinase BB-isoenzyme activity, which may be used as a biochemical indicator of worker intoxication.

*Креатинкиназа - активность - изоферменты - интоксикация - укринол -
биохимический маркер*

Креатинкиназа — ключевой фермент энергетического обмена клетки, физиологическая роль которого состоит в обеспечении транспорта и гомеостазе внутриклеточной энергии [10, 11]. Креатинкиназа (КК) представляет собой ферментную систему, состоящую из ряда изоферментов, специфически локализованных в клетке в местах производства и потребления энергии, как например, митохондрии, миофибриллы, плазматическая мембрана и др. Различают 4 основных изофермента КК: ММ — характерный для мышечной ткани, ВВ — характерный для мозга и внутренних органов, МВ — специфически присутствующий в сердце и митохондриальный изофермент. Благодаря микрогетерогенности субъединиц, каждый из них имеет также свои субизоформы. В клинической практике используется обычно определение 3 первых изоферментов КК [10]. Одной из особенностей КК как фермента является его способность тонко реагировать на структурно-функциональные изменения в клетке, что проявляется в адаптационных изменениях уровня активности КК и его изоферментного спектра. Именно эта способность КК лежит в основе широкого применения его в качестве биохимического маркера различных патологических состояний организма [9, 10], в том числе и этаноловой и ацетоновой интоксикаций [2, 10].

Известно, что действие паров и аэрозолей смазочных масел при обработке алюминия способно вызвать определенные патологические изменения в организме работающих [3]. Ранее нами было проведено исследование влияния широко используемого в алюминиевой промышленности смазочного масла укринол на активность креатинкиназы, пуриннуклеозидфосфорилазы, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в органах и тканях экспериментальных животных, а также в сыворотке крови рабочих фольгопрокатного цеха, имеющих стаж работы не менее 5 лет. Как в случае острой, так и хронической интоксикаций у животных наиболее значительные изменения были обнаружены в отношении КК. Кроме того, в сыворотке крови обследованных нами рабочих наиболее значительные сдвиги были выявлены в активности КК [6]. Эти факты подтверждают данные о высоких адаптационных возможностях КК системы [5, 9, 10]. Одной из причин изменений креатинкиназной активности могли стать сдвиги в изоферментном спектре креатинкиназы.

В настоящей работе представлены данные по изучению изоферментного состава КК в мозге, печени и сыворотке крови крыс в ходе хронической интоксикации укринолом, а также в сыворотке крови рабочих, подвергавшихся влиянию этого промышленного яда не менее 5 лет.

Материал и методика. В опытах были использованы 60 белых нелинейных крыс массой 200–250 г, содержащиеся на постоянном пищевом рационе. Исследуемые дозы укринола вводили животным через зонд непосредственно в пищевод. В хронических опытах крысы ежедневно получали соответствующие дозы в течение 1, 3 и 6 месяцев. Исследуемые органы тщательно отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором, гомогенизировали в 0,1 М трис-ацетатном буфере pH 7,0, содержащем 5 мМ ДДТ и 0,5 мМ ЭДТА, и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге К-24 при 15000 об/мин.

Полученные экстракты тканей использовали для определения активности и ее КК изоферментного спектра.

При исследовании активности и изоферментного спектра КК сыворотки крови рабочих фольгопрокатного цеха завода "Каназ" в качестве контроля использовали сыворотку крови доноров. После свертывания кровь, взятую из локтевой вены натошак, центрифугировали при 3000 об/мин на холоде. Полученную сыворотку хранили при 0-4° не более суток.

Активность креатинкиназы определяли по методу Эннора и Розенберга в собственной модификации и выражали в мкМ креатина / г мин для тканей и в мкМ креатина / л мин для сыворотки крови [4, 6].

Изоферментный состав КК определяли ступенчатой ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе [4]. Активность каждого изофермента выражали в % по отношению к суммарной ферментативной активности.

Для статистической обработки данных использовали экспресс-методы [1].

Результаты и обсуждение. Ранее нами в серии экспериментов по острой и хронической интоксикации крыс, вызванной укринолом, было определено действие этого промышленного яда на мозг и печень животных, а также рассчитана его пороговая доза, равная 3г/кг массы животных [6]. Для выявления характера изменений активности и изоферментов КК в этих органах и сыворотке крови при хронической интоксикации крысам, как и в предыдущих экспериментах, многократно вводили укринол в течение 1, 3 и 6 месяцев в дозах, составляющих 1:100, 1:1000 и 1:10000 пороговой дозы. На рис. 1 и 2 представлены результаты этих экспериментов для печени и мозга крыс соответственно. Как следует из этих данных, изменения активности КК в обоих случаях зависят не столько от дозы укринола, сколько от длительности его воздействия на организм; при этом следует отметить, что эффект малых доз более значительный, чем эффект умеренных доз.

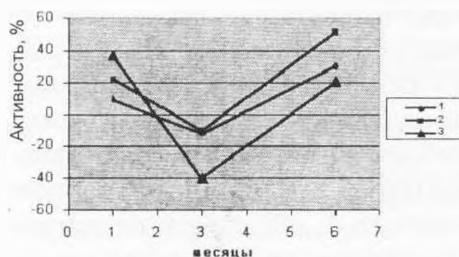


Рис.1. Активность КК печени крыс, подвергнутых хронической интоксикации укринолом в дозах: 1 – 30 мг/кг, 2 – 3 мг/кг, 3 – 0,3 мг/кг массы животных.

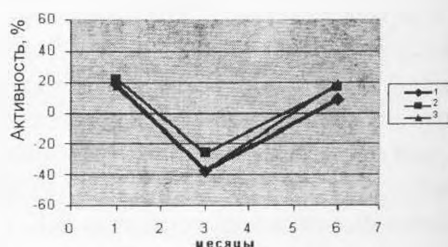


Рис.2. Активность КК мозга крыс, подвергнутых хронической интоксикации укринолом в дозах: 1 – 30 мг/кг, 2 – 3 мг/кг, 3 – 0,3 мг/кг массы животных.

Итак, к концу первого месяца интоксикации наблюдается повышение активности КК (в пределах 10% – 37% для печени и 17% – 22% для мозга) по сравнению с контролем, представляющим собой усредненное значение активности КК в соответствующих органах intactных крыс. Такая компенсаторная реакция ферментной системы может быть следствием повышения экспрессии КК генов. После трех месяцев интоксикации повышение сменяется снижением активности КК вплоть до 40% как в печени, так и в мозге крыс, что свидетельствует о преобладании деструктивных процессов в этих органах к этому времени. Через шесть

месяцев интоксикации наблюдается повторное повышение активности КК, что, по-видимому, является уже следствием включения более глубоких адаптационных процессов, связанных с перестройкой метаболизма. Такая фазовость компенсаторных изменений активности показана как для КК [2, 8, 10], так и для других ферментов энергетического обмена [7]. Одним из наиболее универсальных повреждающих механизмов при различных патологических процессах и, в частности при интоксикациях, можно считать перекисное окисление липидов. Так, показано участие свободнорадикальных механизмов в нейротоксическом действии этанола на мозг крыс и мышей [2, 10].

Изучение изоферментного спектра КК мозга и печени крыс параллельно изменениям ее активности в ходе длительной интоксикации выявило изменений в составе изоферментов по сравнению с контролем: во все сроки интоксикации в этих органах обнаружился исключительно ВВ-изофермент.

В то же время в сыворотке крови этих крыс отмечается значительное перераспределение доли активности изоферментов КК: понижается доля активности ММ-изофермента, повышается доля активности ВВ-изофермента и появляется МВ-изофермент, отсутствующий в норме (рис. 3). Можно предположить, что это является следствием повреждения клеточных мембран мозга и печени крыс, являющихся мишенями действия укринола, и выхода из этих клеток ВВ-изофермента в кровоток. Вследствие процессов диссоциации и ассоциации изоферментов КК в сыворотке крови, возможно, часть В-субъединиц реассоциируется в МВ-изофермент, чем и объясняется появление активности МВ-изофермента.

Исследование нашими коллегами влияния химических (концентрация органических веществ в воздухе) и физических (интенсивность вибрации и звукового давления) факторов на заболеваемость рабочих фольгопрокатного производства, показало, что они могут быть факторами риска в отношении заболеваний костно-мышечной и

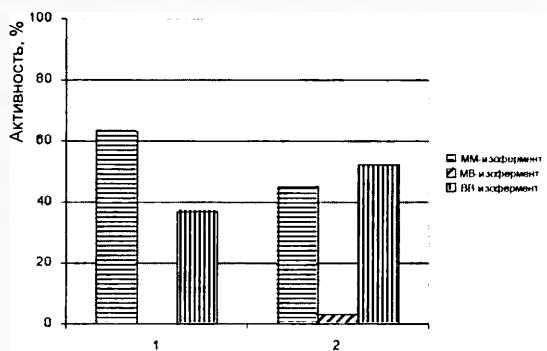


Рис. 3. Распределение изоферментов КК в сыворотке крови крыс, подвергнутых интоксикации укринолом в течение 6 месяцев. 1 - контроль, 2 - опыт.

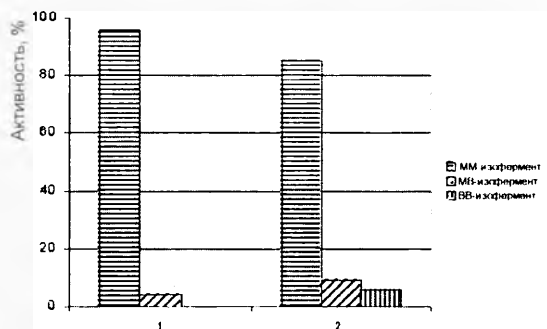


Рис. 4. Распределение изоферментов КК в сыворотке крови рабочих фольгопрокатного цеха. 1 - контроль, 2 - опыт.

периферической нервной систем, а также воспалительных болезней кожи. Наиболее высокий уровень заболеваемости наблюдается в возрастной группе от 31 до 40 лет, по профессиональной принадлежности — среди нагревателей, в зависимости от стажа работы — в группах свыше 5 лет работы [3]. В нашей предыдущей работе, проведенной параллельно с указанным исследованием, среди рабочих этой группы было показано повышение активности КК сыворотки крови более чем на 40% [6]. Исходя из этих данных, мы исследовали изоферментный спектр сыворотки крови 8 рабочих фольгопрокатного цеха, имеющих стаж работы не менее пяти лет, и в сыворотке крови семи из них обнаружили изменения, суммированные в виде диаграммы на рис. 4. Как видно из диаграммы, в сыворотке крови этих рабочих дополнительно к имеющимся в норме ММ и МВ изоферментам появляется некоторое количество ВВ изофермента, источником которого могут быть органы-мишени действия уринола, а именно мозг и печень, и вдвое увеличивается доля МВ изофермента. Таким образом, повышение активности и изменение изоферментного спектра КК в сыворотке крови рабочих фольгопрокатного цеха может отражать функциональное напряжение этих органов и служить тестом при оценке влияния уринола на организм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., Из-во ЛГУ. 1971.
2. Машек О.Н., Усатенко М.С., Лызлова С.Н., Бородин Ю.С. Вестник ЛГУ, 3, 1, 64-68, 1991.
3. Меликян Л.Г., Карагезян К.Г., Асмангулян Т.А. Биолог. журн.Армении, 47, 1, 19-23, 1994.
4. Нерсесова Л.С. Определение активности и изоферментного спектра креатинкиназы в сыворотке крови. Методические рекомендации. Ереван. Изд. АН Арм.ССР, 1987.
5. Нерсесова Л.С., Акопян Ж.Н., Арутюнян А.В., Лызлова С.Н. Мед.наука Армении, 40, 2, 54-57, 2000.
6. Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Меликсетян Г.О., Мкртчян З.С., Зарафян И.М., Погосян Л.Г., Косян С.А., Акопян Ж.Н. Биолог. журн. Армении, 47, 1, 13-19, 1994.
7. Хайдарлиу С.Х. Функциональная биохимия адаптации. Кишинев. 1984.
8. Delahunty T. Biochem.Biophys.Res.Com., 125, 1, 192-198, 1984.
9. Kaye A.M., Tae-Yeon Kim, Sonjen D., Waisman A. Regulation of the creatine kinase B gene and its use as a marker of cell stimulation. <http://bioinfo.weizmann.ac.il/ls/alvin/kaye/alvin.kaye.html>. 1999.
10. Lyzlova S.N., Stefanov V.E. Phosphagen kinases. CRC Press. Boston. 1991.
11. Wallimann Th. Creatine kinase Oh! What a Protein. <http://attila.stevens-tech.edu/chembio/crodick/ck.htm>. 2000.

Поступила 11.V.2005