Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 3 (67), 2015

ВЛИЯНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА КРЕАТИНКИНАЗУ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ОРГАНОВ КРЫС

Л.С. НЕРСЕСОВА, М.С. ПЕТРОСЯН, Ж.И. АКОПЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА
l.nersesova@yahoo.com

Независимо от фактора, которым обусловлен оксидативный стресс, будь то токсическое действие противоопухолевых соединений или ионизирующее облучение, активность креатинкиназы (КК) органа-мишени тонко реагирует на воздействие поражающего фактора. При этом динамика изменений активности КК органа-мишени соответствует изменениям активности и изоферментного спектра КК сыворотки крови, что указывает на изменение проницаемости клеток органа-мишени. Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности креатинкиназы к оксидативному стрессу.

Оксидативный стресс – токсическое действие – противоопухолевые соединения – ионизирующее облучение – активность креатинкиназы – изоферменты креатинкиназы

Անկախ օքսիդացիոն սթրեսը պայմանավորող գործոնից՝ հակառուռուցքային միացությունների տոքսիկ ազդեցությունից, թե իոնացնող ճառագայթումից, թիրախ-օրգանի կրեատինկինազի (ԿԿ) ակտիվությունն արձագանքում է վնասող գործոնի ազդեցությանը: Ընդ որում, նկատվում է համապատասխանություն վնասված օրգանում ԿԿ-ի ակտիվության և արյան շիճուկում ԿԿ ակտիվության և իզոֆերմենտային սպեկտրի միջև, ինչը վկայում է թիրախ-օրգանի բջիջների թափանցելիության փոփոխման մասին: Ստացված տվյալները վկայում են օքսիդացիոն սթրեսի նկատմամբ ԿԿ-ի բարձր զգայնության մասին:

Օքսիդացիոն սթրես – տոքսիկ ազդեցություն – հակառուռուցքային միացություններ – իոնացնող ճառագայթում – ԿԿ ակտիվություն և ԿԿ իզոֆերմենտներ

Creatine kinase (CK) of the target-organs responds to the impact of oxidative stress which was induced by both antitumor compounds and ionizing radiation. Results demonstrate the correlation between the CK activity of a damaged organ and the isoenzyme spectrum of blood serum CK which testifies changes of the membrane permeability of a target-organ. The obtained data obtained show that CK has high sensitivity to oxidative stress.

Oxidative stress – toxic effect – antitumor compounds – ionizing radiation – creatine kinase activity –creatine kinase isoenzymes

Как известно, негативное влияние факторов окружающей среды, и в частности, радиационного и ультрафиолетового излучений, ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов, сопровождается увеличением образования

свободных радикалов в организме, ведущим к развитию оксидативного стресса [4,12].

Структурно-функциональные изменения ферментов, одни из первых мишеней оксидативного стресса, могут быть связаны: 1) с усилением каталитической активности за счет активации синтеза энзимов, блокады разрушения ферментов или активирования самих ферментов; 2) с угнетением каталитической активности за счет угнетения синтеза ферментов, ускорения разрушения ферментов, угнетения их специфической активности; 3) с изменением конформации ферментов.

В настоящей работе обобщены данные по влиянию оксидативного стресса, вызванного, с одной стороны, токсическим действием противоопухолевых соединений, производных диазаадамантанов, с другой – ионизирующей радиацией (ИР) на активность креатинкиназы (КК) жизненно важных органов и сыворотки крови крыс. КК играет ключевую роль в поддержании энергетического гомеостаза в клетке, регулируя в ней потоки энергии [13]. Необходимо отметить, что КК как фермент тонко реагирующий на структурно-функциональные изменения в клетке, широко применяется в качестве маркера ряда сердечно-сосудистых, нейромышечных и опухолевых заболеваний, а также для оценки токсического действия лекарственных препаратов и других экологически опасных агентов, в основе патогенеза которых лежит окислительный стресс [10,13,15]

Материал и методика. В первой серии опытов изучено токсическое действие противоопухолевых соединений 1,5-диметил-9-оксо-3,7-диазабицикло/3.3.1/нонана - (П1) и 2-(2'-гидроксинафтил-1')-5,7-диметил-6-оксо-1,3-диазаадамантана - (П2), синтезированных в Институте тонкой органической химии НАН РА [1,2], на КК жизненно важных органов и сыворотки крови крыс. Опыты проведены на модели перевиваемой опухоли крыс – саркома 45. Через 4 дня после перевивки опухоли животные были разделены на 3 группы по 6 крыс в каждой: 2 подопытные и 1 контрольную. Животным I группы в течение 8 дней вводили внутрибрюшинно соединение $П_1$ в дозе 1мг/кг, II группы - $П_2$ в дозе 140мг/кг, а контрольным животным (III группа) – физиологический раствор. Кроме того, в аналогичных условиях содержалась такая же группа интактных животных (IУ группа), которым по той же схеме вводили физиологический раствор. Показатели активности КК тканей последней группы животных служили для определения исходного контрольного уровня. Через 24 ч после последней инъекции животные всех 4 групп были умерщвлены путем декапитации под эфирным наркозом, оценены массы опухолей и отобраны необходимые органы и сыворотка крови для определения в них активности ферментов. Терапевтический эффект соединений оценивался по проценту торможения роста опухоли по сравнению с контролем.

Во второй серии опытов животные с равноценным распределением по группам (n=6) были подвергнуты однократному тотальному облучению на рентгеновской установке "РУМ-17" в сублетальных дозах 3,5Гр и 4,5Гр и исследованы через 6 и 13 дней после лучевого воздействия (мощность дозы - 1,78 Гр/мин, напряжение - 200кВ, сила тока - 20мА, фокусное расстояние - 50см при отсутствии фильтров). В качестве контроля были использованы соответствующие группы интактных животных. Для исследования активности КК, также как и в первой серии опытов, использовали сыворотку крови и экстракты соответствующих органов. Кровь после свертывания центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 3000 об/мин в течение 20 мин и полученную сыворотку крови использовали в тот же день для определения активности и изоферментного спектра КК. Изъятые органы крыс тщательно отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором, гомогенизировали в 0,1М трис-ацетатном буфере рН 7,0, содержащем 5мМ ДДТ и 0,5мМ ЭДТА, и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге К-24 при 12 000 об/мин. Полученные экстракты тканей использовали для определения активности КК, которую определяли по накоплению креатина [7] и выражали в мкмоль/г мин для тканей и мкмоль/л мин для сыворотки. Изоферментный состав КК определяли ступенчатой ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе [5], выражая активность каждого изофермента в % по отношению к суммарной ферментативной активности. Характер распределения полученных данных определен методом Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ проведен с использованием

непараметрического теста Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p<0.05$. Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического теста Спирмена.

Результаты и обсуждение. Согласно нашим данным, эффективность соединения $П_1$ по торможению роста опухоли крысиной саркомы 45 была равна 78%, но при этом оно проявляло значительную токсичность ($ЛД_{100}$=300мг/кг); соединение $П_2$ отличалось незначительной токсичностью ($ЛД_{100}$>5000мг/кг), но и сравнительно меньшей (Т%=61) противоопухолевой эффективностью [1,2]. В наших экспериментах соединения $П_1$ и $П_2$, используемые в терапевтических дозах, проявили умеренное торможение роста опухоли: терапевтический эффект их составлял 59% и 50% соответственно. Общее физиологическое состояние животных было удовлетворительное.

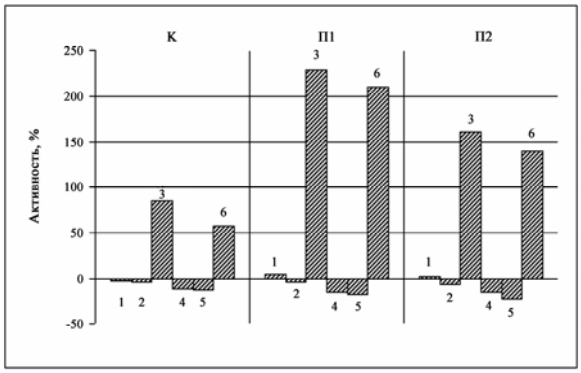

Рис. 1. Изменения уровня активности КК в органах и сыворотке крови контрольных крыс с индуцированной подкожной опухолью (контроль) и опытных крыс, подвергнутых действию препаратов $П_1$ и $П_2$, по отношению к активности КК в соответствующих органах и в сыворотке крови интактных животных.
(1– мозг, 2– бедренная мышца, 3– печень, 4– почки, 5– сердце, 6– сыворотка крови)

На рис.1 представлена диаграмма распределения активности КК в жизненно важных органах крыс в контрольной и опытных группах по отношению к уровню активности фермента соответствующих органов интактных крыс. Эти данные свидетельствуют о том, что в контрольной группе животных развитие опухоли вызывает значительное увеличение уровня активности КК в печени, почти на 85%, и в сыворотке крови – на 57%. В то же время в сердце, почках, в мозге и бедренной мышце контрольных крыс статистически достоверных изменений уровня активности фермента не обнаруживается.

Оценку токсического действия исследуемых соединений проводили на основании сравнения уровня активности фермента в органах животных опытных и контрольных групп и дополнительные изменения активности в них относили на счет токсического действия препаратов. Оказалось, что наиболее значительное токсическое действие оба препарата проявляют в отношении печени: более токсичный из них – $П_1$ вызывает дополнительное компенсаторное возрастание активности КК на 144%, а менее токсичный $П_2$ – на 76%. В то же время отмечаются статистически недостоверные изменения уровня активности КК в почках и в сердце крыс как в случае $П_1$, так и в случае $П_2$ (рис.1). В мозге и бедренной мышце эти препараты не вызывают изменений ферментативной активности.

Из рис.1. следует также, что токсикологическая нагрузка на печень ведет к увеличению уровня активности КК в сыворотке крови, по-видимому, в связи с из

менением проницаемости клеточных мембран этого органа: в случае $П_1$ – на 153% и $П_2$ – на 83%.

Для подтверждения этого предположения исследовали изменения изоферментного спектра КК сыворотки крови экспериментальных крыс. В связи с этим следует отметить, что в отличие от сывороточной КК человека, которая в норме представлена в основном ММ-изоферментом (95-98%) и следами МВ-изофермента (2-5%) при полном отсутствии ВВ-изофермента, в сыворотке крови крыс при преобладающем содержании ММ-изофермента обнаруживается и значительная доля ВВ-изофермента [15].

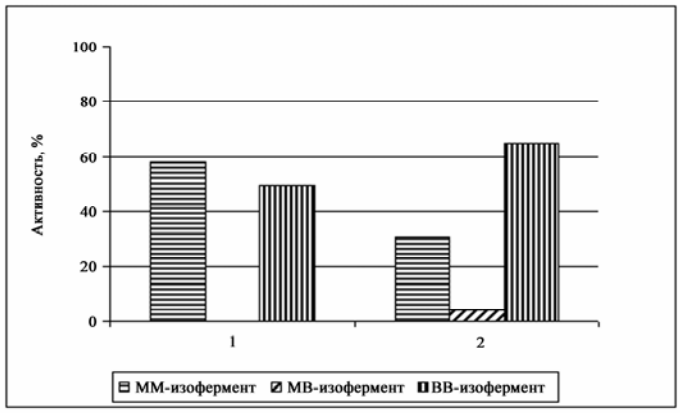

Рис. 2. Распределение изоферментов КК в сыворотке крови крыс контрольной группы (1) и подвергнутых действию препарата $П_1$ (2)

На рис.2 представлена диаграмма распределения изоферментов КК в сыворотке крови крыс контрольной группы (1) и подвергнутых действию препарата $П_1$ (2), которая свидетельствует о смещении изоферментного спектра КК сыворотки крови в сторону значительного увеличения доли ВВ-изофермента и появления активности МВ-изофермента. В связи с этим следует отметить, что печень крысы содержит исключительно ВВ-изофермент [15], в данном случае именно гепатоциты могли стать источником дополнительного количества ВВ-изофермента в сыворотке крови.

Таким образом, токсическое действие исследованных препаратов приводит к: адаптационному возрастанию активности КК печени крыс, а также изменению проницаемости клеточной мембраны гепатоцитов, что ведет к увеличению доли ВВ-КК в сыворотке крови; последнее может быть использовано в качестве показателя гепатотоксичности ксенобиотиков.

Во второй серии опытов было изучено влияние однократного тотального рентгеновского облучения в дозах 3,5Гр и 4,5Гр на активность КК мозга, печени, селезенки, почек и сыворотки крови крыс в разные пострадиационные сроки. Исходя из данных литературы, в эти сроки ожидались наиболее выраженные изменения активности ферментов [3,6,8]. Были составлены опытные группы: а – 3,5 Гр/6 сут, б – 3,5 Гр/13 сут, в – 4,5 Гр/6 сут, г – 4,5 Гр/ 13 сут. В качестве контроля были использованы группы интактных животных, соответствующие каждой из перечисленных опытных групп.

Как видно из рис.3а, через 6 сут наблюдаются значительные разнонаправленные изменения уровней активности КК почти во всех исследованных органах: в мозге, сыворотке крови и селезенке подопытных крыс обнаруживается статисти

чески достоверное повышение уровня активности КК примерно на 40-100%; в печени его активность падает на 46 %; в почках уменьшение активности КК по сравнению с контрольным уровнем статистически недостоверно. На 13 сут в мозге и почках наблюдается тенденция возвращения активности КК к исходному уровню (рис.3б); в селезенке уровень активности фермента продолжает возрастать, достигнув 150%-ного превышения над уровнем контроля, тогда как в печени понижение активности сменяется статистически достоверным повышением уровня активности КК по сравнению с контролем почти в 2 раза, а в сыворотке, наоборот, повышение сменяется достоверным понижением уровня активности КК примерно на 25%.

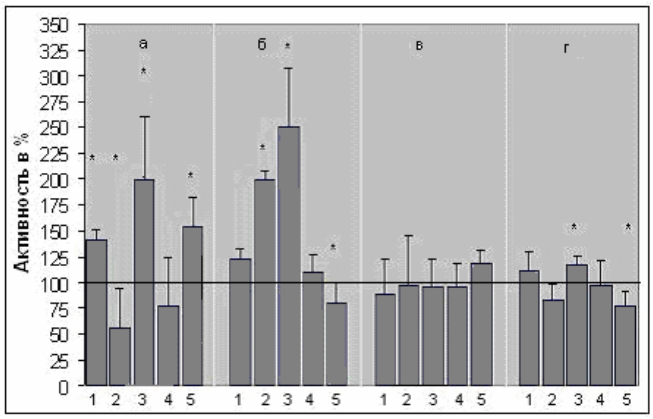

Рис. 3. Изменения уровней активности КК в органах крыс, индуцированных сублетальными дозами ионизирующего облучения, в различные пострадиационные сроки (а – 3,5Гр/6сут, б – 3,5Гр/13сут, в – 4,5Гр/6сут, г – 4,5Гр/13сут);
1 – мозг, 2 – печень, 3 – селезенка, 4 – почка, 5 – сыворотка крови; * - $p< 0,05$)

Во второй серии опытов мы исследовали влияние более высокой дозы облучения, а именно 4,5Гр, и добавили еще 2 пострадиационных срока – 1-е и 3-е сутки. Оказалось, что однократное облучение в дозе 4,5Гр через сутки индуцирует статистически достоверные изменения уровня активности КК по сравнению с контролем только в селезенке и сыворотке крови: уровень активности КК в селезенке падает в 1,6 раза ($p<0,05$) и повышается в сыворотке крови почти в 2 раза ($p<0,05$), причем между этими изменениями имеет место статистически достоверная корреляция ($p<0,01$). Изменения уровней активности КК в остальных исследованных органах к этому сроку были статистически недостоверными.

Через 3 сут наблюдается обратная картина: в сыворотке крови уровень креатинкиназной активности падает в 1,4 раза ($p<0,05$), а в селезенке резко повышается, почти в 5 раз по сравнению с контролем, но корреляции между этими изменениями уже нет. В остальных органах, как и в первые сутки, изменения КК-активности были статистически недостоверными.

На 6 сут в селезенке наблюдается возвращение уровня активности КК к контрольному (рис.3в), а на 13 сут имеет место статистически достоверное, но небольшое повышение активности этого фермента – примерно на 20% (рис.3г). Кроме того, на 13 сут регистрируется статистически достоверное 25%-ное падение уровня активности КК в сыворотке крови подопытных крыс (рис.3-г). В остальных органах изменения уровня активности КК не определяются.

Приведенные данные свидетельствуют об отсутствии прямо пропорциональной зависимости между величиной дозы облучения и величиной изменений уровня активности КК, что отмечалось и для других ферментов [3, 8, 11].

Однако, если учесть фазовость изменений уровня активности КК, связанную, по-видимому, с включением на разных пострадиационных сроках разных адаптационных механизмов клетки, нельзя исключить, что при выборе других сроков может наблюдаться иная картина. Необходимо отметить, что колебательные изменения уровней активности, а также изоферментных спектров и кинетических параметров показаны для ряда ферментов и в целом характерны для пострадиационных биологических эффектов [3, 6, 9, 11].Таким образом, изменения уровней активности КК различных органов, индуцированные ИР, имеют фазный характер и разнонаправлены как во времени, так и в зависимости от дозы, что свидетельствует о включении в разных органах и на разных этапах различных адаптационных механизмов. При использованных дозах облучения на 13 сут после облучения, за некоторым исключением, для всех исследованных ферментов намечается тенденция восстановления уровней активности до исходного.

Наши данные свидетельствуют о том, что независимо от фактора, которым обусловлен оксидативный стресс, а в данном случае токсическим действием лекарственных препаратов или ИО, активность КК органа-мишени тонко реагирует на воздействие поражающего фактора. При этом наблюдается корреляция между активностью КК пораженного органа и активностью и изоферментным спектром КК сыворотки крови, что указывает на изменение проницаемости клеток органа-мишени. В связи с этим следует отметить недавно полученные данные о значительно более высокой чувствительности КК к оксидативному стрессу, чем ряда других ферментов, в частности, трипсина, РНК-аз, оксидаз D-аминокислот, каталазы и АТФ-азы [14,16].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агаджанян Ц.Е., Арутюнян А.Д., Арутюнян Г.Л. и др.* Взаимосвязь химическая структура – биологическая активность. Ереван, АН РА, с.92-98, 1998.
2. *Агаджанян Ц.Е., Саакян Г.С., Арутюнян Г.Л. и др.* Химиотерапия опухолей в СССР. М., Наука, с. 65, 1987.
3. *Матюшичев В.Б., Таратухин В.Р., Шамратова В.Г., Южакова Г.А., Петрова Т.А.* О биохимических сдвигах в коже крыс, облученных на фоне теплового стресса. Радиобиол. *18*, вып.2, с.275-277, 1978.
4. *Нагорная Н.В., Четверик Н.А.* Влияние на организм человека оксидативного стресса и методы его оценки. Клинические лекции. Здоровье ребенка, *2*, вып.23, 2010.
5. *Нерсесова Л.С.* Определение активности и изоферментного спектра креатинкиназы в сыворотке крови. Методические рекомендации. Ереван. Из-во АН Арм. ССР, 1987.
6. *Нагиев Э.Р.* Влияние ионизирующей радиации и физ. нагрузки на молекулярную гетерогенность нуклеозидфосфаткиназ в субклеточных фракциях печени. Радиац. биол. Радиоэкол., *35*, вып. 4, с. 494-499, 1995.
7. *Петрова Т.А., Лызлова С.Н.* Оптимизация условий определения активности креатинкиназы колориметрическим методом. Вестник ЛГУ, 24, с.88-90, 1985.
8. *Рева А.Д., Живалюк О.Б., Лукьяненко А.И., Егорова Е.Г., Дворецкий А.И.* Влияние хронического рентгеновского излучения в малых дозах на активность γ-глутамилтранспептидазы в органах и тканях крыс. Радиац.биол.Радиоэкол., *35*, вып.6, с.869-872, 1995.
9. *Трещенкова Ю.А., Бурлакова Е.Б.* Изменение кинетических свойств альдолазы и лактатгидрогеназы цитоплазмы мозга мышей после хронического Y-облучения в малых дозах. Радиац. биол. Радиоэкол., *37*, вып.1, с.3-11, 1997.

10. *Хлгатян Дж.С., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Меликсетян Г.О., Мкртчян З.С., Погосян Л.Г., С.Р.Костандян, Акопян Ж.И.* Влияние хлоропрена и его производных на ферментные системы рабочих, занятых в производстве синтетического каучука. Токсиколог. вест., 2 , с..9-15, 2009.
11. *Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г., Тодоров И.Н.* Временные и дозозависимые пострадиационные изменения в содержании $РЕ^{3+}$-трансферина и $СИ^{2+}$-церулоплазмина в крови животных, их влияние на рибонуклеотидредуктазную активность тканей. Радиац. биол. Радиоэкол., *43*, вып**.** 6, с. 662-677, 2003.
12. *Andersen J.K.* Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nature Rev. Neurosci., 5, pp.18-25, 2004.
13. Salomons G.S., Wyss M. Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease. Springer., *46*, pp 309-335, 2007.
14. *Koufen P., Stark G.* Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery. Biochim.Biophys.Acta. *1501*, 1, pp 44-50, 2000.
15. *Lyslova S.N., Stefanov V.E*. Phosphagen kinases. CRC Press, Boston. 1991.
16. *Malone J.,Ullrich R.* Novel radiation response genes identified in gene-trapped MCF10A mammary epithelial cells. Radiat. Res. *167*, 2, pp.176-184**,** 2007.

Поступила 19.03.2015

Список сокращений

КК- креатинкиназа
ИР-ионизирующая радиация
$П_1$-1,5-диметил-9-оксо-3,7-диазабицикло/3.3.1/нонан
$П_2$-2-(2'-гидроксинафтил-1')-5,7-диметил-6-оксо-1,3-диазаадамантан
ММ – мышечный изофермент креатинкиназы
ВВ – мозговой изофермент креатинкиназы
МВ – сердечный изофермент креатинкиназы
ЭДТА-этилендиаминтетраацетат
ДТТ- дитиотрейтол
ДЕАЕ целлюлоза- диэтиламиноэтилцеллюлоза
Гр-Грей
ИО-ионизирующее облучение
АТФ-аденозинтрифосфат
РНК-рибонуклеиновая кислота