

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ГАЛАРМИНА ПРИ ПРОПАН- ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС

Р. М. СИМОНЯН

*Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник, доцент ГГУ,
Институт биохимии НАН РА*

М. А. БАБАЯН

*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Института биохимии НАН РА*

Г. М. СИМОНЯН

*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Института биохимии НАН РА*

М. А. СИМОНЯН

*Доктор биологических наук, профессор, в.н.с.
Института биохимии НАН РА*

Одной из важнейших функций легких является обеспечение организма достаточным кислородом. Однако, этот орган может повреждаться при гипоксии, на фоне изменения анти- и прооксидантного статусов, с повышением последнего. Это вызывает оксидативное повреждение в первую очередь эпителиальных клеток сосудов легких, вызывая их сужение и отек легких. Возникновение гипоксии наблюдается и при газовой интоксикации, с обструктивной остановкой дыхания во сне и астматическим приступом. Острая легочная гипоксия в большинстве случаев связана с повышением легочного артериального давления, с нарушением функционирования эпителиальных клеток и с воспалением легких. Эти изменения являются результатом воздействия активных форм кислорода, в частности, супероксидных радикалов [1-5]. В этих условиях особенно увеличивается ферментативное продуцирование супероксидов **NADPH** оксидазой (**Nox**) в митохондриях клеток легких. Фактически, увеличение уровня супероксидов является ответом адаптационных систем организма для экономного использования малых доз молекулярного кислорода. Такой эффект наблюдается при CO_2 - индуцированном кислородном голодании, когда наблюдается резкое повышение уровня и **NADPH** зависимой супероксид-продуцирующей активности изоформ клеточных и внеклеточных **Nox** [6]. Однако исследования для одновременного и комплексного определения на оптическом-спектральном уровне содержания изоформ **Nox** из субклеточных формироний клеток

легких, а также из эритроцитарных мембран и сыворотки крови крыс при пропан-индуцированном кислородном голодании белых крыс еще не проведены.

Целью работы являлось определение уровня изоформ клеточной и внеклеточной NADPH оксидазы (Nox) при пропан-индуцированном кислородном голодании белых крыс, в отсутствие и под влиянием синтетического аналога, богатого пролином полипептида из нейросекреторных гранул галармина.

Материал и методы

В первой опытной группе (ОГ-1) белые половозрелые крысы (12 животных, массой в 220-240г) были подвергнуты кислородному голоданию в барокамере под влиянием пропана (с давлением 50 мм ртутного столба). Во второй опытной группе (ОГ-2) крысам (12 животных) вводили галармин (25 мкг/кг массы животного) в профилактическом режиме (для отличия эти крысы были окрашены). Животные ОГ-1 и ОГ-2 были подвергнуты кислородному голоданию одновременно в аналогичных условиях в течение 60-65 мин. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом.

Изоформы Nox из эритроцитарных мембран (ЭМ), из сыворотки крови (экстрацеллюлярная Nox), из мембран, митохондрий, ядер и цитозоля клеток легких выделяли и очищали с применением ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52, KM-52, на сефадексе DEAE - 50 (продукции фирмы ,Whatmanb Англия) и гель фильтрации на сефадексе G-100 ("Pharmaciab, Швеция) [7]. NADPH зависимую супероксид-продуцирующую активность Nox определяли нитротетразолиевым синим методом [8]. Удельное содержание изоформ Nox определяли путем вычисления плотности оптического поглощения (при 560 нм) изоформ Nox, полученной из 1г ткани легких, 1мл эритроцитов или 1мл сыворотки крови крыс.

Оптические спектральные измерения осуществлялись на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности «P».

Результты и обсуждение

В результате пропан-индуцированной гипоксии в приведенных условиях у крыс ОГ-1 начинаются характерные симптомы гипоксии (увеличение частоты дыхания, изменение цвета глаз, падение в состояние комы) и гибель животных (10-12%). Под влиянием галармина в ОГ-2,

частота дыхания животных несколько снижается, однако они чувствуют себя сравнительно хорошо, и приведенные симптомы практически отсутствуют, не наблюдается и гибель животных. При этом, по сравнению с контрольными показателями, удельное содержание изоформ Nox из ЭМ и сыворотки крови в ОГ-1 повышается $23,2 \pm 4,1\%$ и $48,5 \pm 6,2\%$ ($n=6$, $p=,005$) соответственно (рис.1). В ОГ-2, под влиянием глармина, приведенные показатели продолжают повышаться: для Nox из ЭМ они составляет $105,4 \pm 11,3\%$ и $300,7 \pm 32,8\%$ для Nox из ЭМ и сыворотки соответственно. В ОГ-1 эта закономерность наблюдается и у Nox из мембран клеток и, особенно, из митохондрий клеток печени (рис.2). При этом, в ОГ-1 под влиянием глармина удельное содержание Nox из митохондрий повышается на $306,5 \pm 19,9\%$. Однако, как это показано на рис.3, по сравнению с контролем, содержание изоформ Nox в ядрах и цитазоле клеток легких более толерантно к пропан-индуцирующей гипоксии, хотя под влиянием глармина наблюдается прирост уровня изоформ Nox (рис.3).

По сравнению с контролем, NADPH зависимая супероксид–продуцирующая активность изоформ приведенных Nox в ОГ-1 несколько снижается (до 8-16%), однако в ОГ-2, наоборот, эта активность повышается до 14-20%.

Фактически, при пропан индуцирующей гипоксии адаптационные системы организма, мобилизуя свои ресурсы, повышают уровень изоформ Nox крови и клеток легких для бережного использования имеющихся малых количеств кислорода, для продуцирования супероксидов, крайне необходимых для обеспечения аэробных метаболических процессов. С этой точки зрения, путем увеличения уровня и активности Nox в крови и клеточных формированиях легких, глармин оказывает защитный эффект при пропан-индуцирующей гипоксии.

Действуя аналогичным способом, экзогенно введенный глармин в профилактическом режиме оказывает протективный эффект при CO_2 – индуцированной гипоксии крыс [6]. Такой эффект глармина, скорее всего, может быть связан с нейтрализацией высокоактивных гидроксильных радикалов [9], которые вызывают оксидативное повреждение различных биосистем, включая изоформы Nox.

Можно заключить, что глармин в профилактическом режиме может быть применен при пропан-индуцирующей гипоксии.

Ключевые слова: гипоксия, глармин, NADPH оксидаз

ЛИТЕРАТУРА

1. **Sylvester T., Shimoda L. A., Aaronson P. I., Ward J. P. T.**, Hypoxic J pulmonary vasoconstriction, *Physiological Reviews*, 2012, 92(1): 367–520.
2. **Dada C. L. Sznajder J. I.**, Hypoxic inhibition of alveolar fluid reabsorption. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, 618: 159–168.
3. **Gonzalez N. C.**, Wood, Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO₂ does and does not do. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 662: 27–32,
4. **Ismail S., Sturrock A., Wu P. et al.**, NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(3):L489–L499.
5. **Fresquet F. Pourageaud, F, Leblais V. et al.**, Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia, *British Journal of Pharmacology* 2006., 148(5), 714–723.
6. **Simonyan R. M., Melconyan L. G., Babayan M. A., Simonyan G. M., Arakelyan L. N., Simonyan M. A., Galoyan A. A.**, The protective role of a hypothalamic proline-rich peptide during acute intoxication of rats by carbon dioxide in combination with oxygen starvation. *Neurochemical Journal*, 2013, 7(1): 56-61.
7. **Симонян Г. М., Симонян Р. М., Симонян М. А.**, Способ получения цитохрома b₅₅₈-из клеточных компонентов // Лицензия изобретения N 2233А Армпатента, Ереван, 2008.
8. **Simonyan G. M., Galoyan K. A., Simonyan R. M., Simonyan M. A., Galoyan A. A.**, Proline Rich polypeptide (PRP-1) Increases the Superoxide-Producing and Ferrihemoglobin Reducing Activities of Cytochrome b₅₅₈ isoforms from Human Lymphosarcoma Tissue Cells. // *Neurochem.Res.*, 2011, 36: 739-745.
9. **Galoyan A. A.**, Brain immune system: Chemistry and biology of the signal molecules. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, 3rd ed., (Editor in chief- professor Abel Lajtha) v. Neuroimmunology (eds. A. Galoyan and H. Besedovsky), 2008, p. 155-195.

ԳԱԼԱՐՄԻՆԻ ՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ԴԵՐԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՍՈՏ ՊՐՈՊԱՆՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ ՀԻՊՕՔՍԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ո. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, ԳԴՀ դոցենտ,
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի ավագ գիտաշխատող*

Մ. Ա. ԲԱԲՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու,
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի
ինստիտուտի ավագ գիտաշխատող*

Գ. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու,
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի ավագ գիտաշխատող*

Մ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր,
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի ավագ գիտաշխատող*

Պրոպանոլ հարուցված հիպօքսիայի ժամանակ առնետների արյան և թոքի բջջաբաղադրամասերում ՆԱԴԲԻ օքսիդազի (Nox) իզոմերների քանակական որոշման համալիր հետազոտություններ դեռևս չեն իրականացվել: 60-65 րոպե տևողությամբ պրոպանոլ (50 մմ սնդիկի սյան ճնշմամբ) հարուցված հիպօքսիայի ժամանակ դիտվում է առնետների էրիթրոցիտներից ու արյան շիճուկից, ինչպես նաև թոքի հյուսվածքի բջջաբաղադրամասերից (բջջաթաղանթ, կորիզ, միտոքոնդրիում, ցիտազոլ) Nox-ի իզոմերների տարբեր քանակներով աճ (շուրջ 1,5-2 անգամ): Պրոֆիլակտիկ ռեժիմով ներվորովայնայն ներարկված գալարմինը (25 մկգ/կգ) էապես բարելավում է կենդանիների վիճակը, կանխելով դրանց մահվան ռեպերը: Գալարմինի կարգավորիչ դերը կարելի է նաև կապել այն բանի հետ, որ այդ նեյրոակտիվ և հակաօքսիդանտային հատկություններով օժտված պոլիպեպտիդը շարունակում է էապես բարձրացնել Nox-ի նշված իզոմերների մակարդակը նշված կենսահամակարգերում, ապահովելով նվազագույն քանակի թթվածնի խնայողաբար օգտագործման գործընթացը:

Ըստ ստացված տվյալների՝ գալարմինը կարելի է օգտագործել պրոպանոլ հարուցված թթվածնային քաղցի դեպքում:

THE PROTECTIVE ROLE OF GALARMIN AT PROPANE-INDUCED HYPOXIA IN THE RATS

R. M. SIMONYAN

*PhD of Biology, GSU Assistant Professor,
Senior Scientist at the H.Buniatian Institute of Biochemistry, NAS RA, Yerevan*

M. A. BABAYAN

*PhD of Biology, GSU Assistant Professor,
Senior Scientist at the H.Buniatian Institute of Biochemistry, NAS RA, Yerevan*

G. M. SIMONYAN

*PhD of Biology,
Senior Scientist at the H.Buniatian Institute of Biochemistry, NAS RA, Yerevan*

M. A. SIMONYAN

*Doctor of Biology, Professor,
Senior Scientist at the H.Buniatian Institute of Biochemistry, NAS RA, Yerevan*

At propane-induced hypoxia, complex studies aimed at the determination of the level of isoforms of NADPH oxidase (Nox) in the rat blood and lung tissue cell components have not been carried out yet. At 60-65 min propane (50mm Hg)-induced hypoxia, an increase of the amount (1,5-2 times) of isoform of Nox from rat erythrocyte membranes and blood serum, as well as from lung tissue cell components (cell membranes, nucleus, mitochondria and cytosole) is observed. Under the influence of galarmin (25mg/kg) at prophylactic regime the state of animals significantly improves, preventing their death. The regulating role of galarmin can be also associated with the fact that this polypeptide having antioxidant and neuroactive properties continues to significantly increase the level of isoforms of these Nox in given biosystems, ensuring the economical use of minimal amount of oxygen.

On the basis of presented data, the galarmin can be used during propane-induced oxygen starvation.

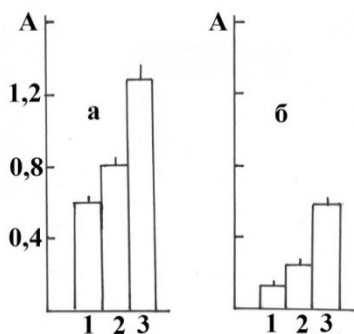


Рис 1. Плотность максимального оптического поглощения Nox (при 530 нм) из эритроцитарных мембран (а) и из сыворотки крови (б) у контрольных крыс (1), после пропан-индуцированной гипоксии (2), после внутрибрюшинного введения животным галармина (25 мкг/кг веса животного) в профилактическом режиме и подачи пропана (3).

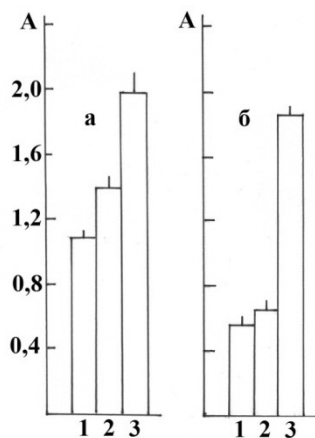


Рис 2. Плотность максимального оптического поглощения Nox (при 530 нм) из клеточных мембран (а) и из митохондрий клеток легких (б) у контрольных крыс (1), после пропан-индуцированной гипоксии (2), после внутрибрюшинного введения животным галармина (25 мкг/кг веса животного) в профилактическом режиме и подачи пропана (3).

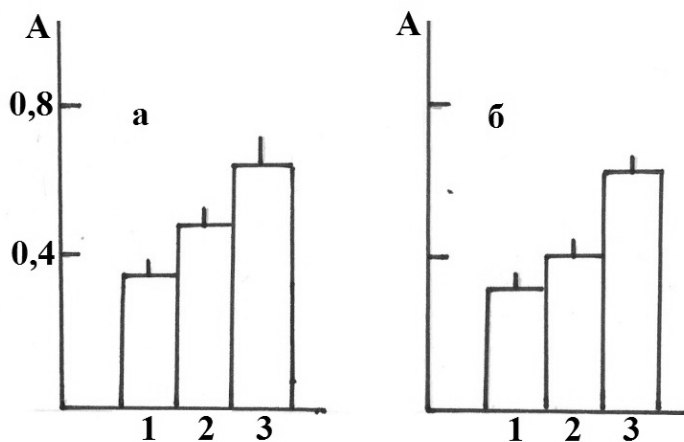


Рис. 3. Плотность максимального оптического поглощения N_{ox} (при 530 нм) из ядер (а) и цитозоля (б) клеток легких у контрольных крыс (1), после пропан-индуцированной гипоксии (2), после внутрибрюшинного введения животным галармина (25 мкг/кг веса животного) в профилактическом режиме и подачи пропана (3).