

БИОХИМИЯ

УДК 577.112.612.01.043

**А.Е. Арутюнян, Серг.С. Алексанян, М.А. Бабаян, С.С. Алексанян,
М.А. Симонян, академик А.А. Галоян**

Регулирующий эффект галармина при гипотермии

(Представлено 12/IV 2002)

Гипотермия приводит к определенному замедлению метаболических процессов, сопровождающихся ингибированием процесса апоптоза и транслокацией цитохрома С у мышей *in vitro* [1]. При охлаждении у крыс повышается уровень мозгового оксигированного гемоглобина [2], имеют место экспрессия Cu,Zn -супероксиддисмутазы (Cu,Zn-СОД) [3] и дискоординация метаболизма в сердечной ткани. Эти отклонения несколько ослабляются под воздействием антиоксидантных систем (α -токоферола и пантетина) [4], что свидетельствует об определенной роли активных форм кислорода (АФК), в частности супероксидных радикалов (O_2^-) при гипотермии. O_2^- , вовлеченные в процесс изменения проницаемости кровью-мозгового барьера, при охлаждении мозговой ткани вызывают у мышей отек (эдема), травму и ишемию мозга [5]. Эти явления заметно уменьшаются у трансгенетических мышей с геном человеческой Cu,Zn-СОД. В результате охлаждения в гомогенатах почек кролика СОД-активность не меняется, а после трансплантации наблюдается повышение уровня липидной перокси- дации [6]. Целью работы является комплексное определение характерных количественных изменений металлопротеинов и липидной пероксидации в крови и других тканях крыс при их охлаждении и выявление возможной антистрессорной роли пролинбогатого синтетического нейроактивного пептида - галармина.

Белые крысы-самцы массой 200-220 г, содержащиеся в полноценном кормовом режиме в течение 30 дней до начала эксперимента, были разделены на 3 группы (по 10 в каждой). Контрольные животные получали физраствор (по 1 мл) и содержались при комнатной температуре. Животные первой опытной группы (ОГ-1) получали по 1 мл физраствора. Животным второй опытной группы (ОГ-2) вводили по 1 мл галармина (по 40 μ) за 1 ч до охлаждения. Животных ОГ-1 и ОГ-2 держали на холоде при -10° в течение 24 ч. При этом гибели животных не наблюдалось. Животных всех групп декапитировали под легким эфирным наркозом и в отдельности собирали кровь, стабилизируя ее в натрий-оксалатном буфере. Одновременно брали печень, почки, сердце и мозг.

Металлопротеины крови прооксидантного действия (МПД) (цитохром b_5 выделяли из растворимой фракции эритроцитов; цитохром b_{558I} и b_{558II} - из сыворотки крови; цитохром

b_{558III} - из мембран эритроцитов; супероксидпродуцирующий липопротеин - супрол - из сыворотки крови) и антиоксидантного действия (МАД) (Cu,Zn-СОД и каталаза, выделенные из растворимой фракции эритроцитов; церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) - из сыворотки крови) одновременно были выделены и очищены по разработанному нами способу [9] без применения детергента [10]. Отдиализованные белковые фракции сыворотки, эритроцитарных мембран и плазматической части эритроцитов подвергали ионообменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексом DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция). Количество металлопротеинов определяли по величине плотности максимальных оптических поглощений, характерных для цитохрома b_5 при 525 нм, цитохромов $b_{558I} - III$ при 530 нм, супрола при 430 нм (слабое плечо), ЦП при 610 нм и ТФ при 470 нм. Ткани гомогенизировали в 0.04 М калий-фосфатном буфере (КФБ), рН 7.4. По 0.5 мл гомогенатов отделяли для определения продукта аскорбатзависимой липидной пероксидации - малонового диальдегида (МДА) по методу [11]. Фракции СОД, каталазы и цитохрома С из гомогенизатов тканей выделяли по методу [12], с целью одновременного получения и цитохрома С. Для этого отдиализованные фракции гомогенатов тканей центрифугировали и супернатанты пропускали в отдельности через KM-52. Из этих колонок цитохром С элюировали 0.2 М КФБ, Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС), рассчитав проценты ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами (O_2^-) в присутствии СОД или супрола соответственно. Каталазную активность определяли перманганатометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (М) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°. Удельные активности приведенных ферментов определяли в расчете на 1 мл эритроцитов, 1 г ткани или 1 г сыворотки. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре "Specord UV VIS"(Германия) с длиной оптического пути 1 см. В процессе выделения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия) и стеклянные колонки с фильтрами различных размеров (2×30, 4×20, 1×15 см). Опыт повторяли 4 раза. Статистичес-

Относительные изменения уровней металлопротеинов и МДА в крови и других тканях крыс (по сравнению с нормой, показатели которой принимаются за 100%) после переохлаждения ($P < 0.05$, $n = 4$)

Металлопротеины	Гипотермия (ОГ-1)	Гипотермия (ОГ-2)
Кровь		
Цитохром b_5	+20.2 ± 3.1	+40.0 ± 4.9
Цитохром $b_{558I} + II$	-44.5 ± 5.4	-14.5 ± 1.7
Цитохром b_{558III}	-10.1 ± 2.1	-21.2 ± 2.1
Супрол	-14.3 ± 2.3	-7.2 ± 1.1
O_2^- -продуц. актив. супрола	-9.3 ± 4.8	-16.5 ± 1.4
ЦП	Нет изм.	Нет изм.
ТФ	-18.2 ± 2.4	-32.4 ± 2.9
СОД	Нет изм.	Нет изм.
Каталаза	-58.7 ± 6.1 ($P < 0.02$)	-29.7 ± 2.7 ($P < 0.02$)

Печень		
Сu, Zn-СОД + Mn-СОД	+3.1 ±0.2	-2.3 ±0.2
Каталаза	+173.0 ± 11.4 (P < 0.01)	+118.0±10.8 (P < 0.02)
Цитохром С	+10.0±1.9	+20.1 + 2.9
МДА	+115.0±10.2 (P < 0.03)	Нет изм.
Почки		
Сu, Zn-СОД + Mn-СОД	-4.2 + 0.2	-2.1 + 0.2
Каталаза	-59.2 + 7.3 (P < 0.01)	-10.0 + 1.5
Цитохром С	+16.6±1.9	+25.0 + 2.7
МДА	-26.2 + 3.1	-42.6 + 4.9 (P < 0.04)
Сердце		
Сu, Zn-СОД + Mn-СОД	+7.0 + 0.2	+3.5 + 0.3
Каталаза	+16.6 + 2.4	Нет изм.
Цитохром С	+10.5±1.8	+10.5 + 1.1
МДА	-50.0 + 7.0	-70.0 + 4.7
Мозг		
Сu, Zn-СОД + Mn-СОД	+4.9 + 0.3	+4.7+ 1.2
Каталаза	-64.0 + 8.1	Нет изм.
Цитохром С	+36.0 + 5.0	-6.0±1.4
МДА	-33.3 + 5.1	-34.1 +2.9

кую обработку полученных результатов осуществляли методом Стьюдента - Фишера.

В результате переохлаждения в приведенном режиме в крови животных баланс между расчетными уровнями МПД (цитохромы b_5 , $b_{558I-III}$) и МАД (СОД, каталаза и ЦП) практически не нарушен и составляет соответственно 84.9 и 86.9% по сравнению с нормой. Наблюдается общее снижение уровня метаболитов-регуляторов метаболизма АФК с соответственным понижением течения аэробных метаболических процессов с участием АФК при гипотермии. При этом уровни ЦП и СОД не изменяются (ОГ-1, таблица). Понижение O_2^- -продуцирующей активности супрола скорее всего связано с понижением уровня его расходования путем перекисного окисления собственных фосфолипидных остатков и самоактивирования в условиях *in vivo* [13]. Снижение уровней цитохромов b_5 , $b_{558I-III}$ и супрола приводит к соответственному снижению уровня продуцируемых ими O_2^- и их производных (H_2O_2 , HO^* , NO^* и др.). Это в свою очередь несколько замедляет течение метаболических путей с участием АФК при переохлаждении, хотя эти изменения еще далеки от критической границы и не приводят к гибели животных. С другой стороны, понижение уровня O_2^- (других АФК) вызывает соответственное снижение расходования СОД и ЦП и уменьшает степень дезактивирования последних [14, 15]. В результате эндогенные уровни этих ключевых МАД остаются практически неизменными. Эти данные хорошо коррелируют с литературными данными [6]. Под воздействием галармина продолжают понижаться только уровни цитохрома b_5 , цитохромов $b_{558I-III}$ и ТФ. Уровни же остальных МПД и МАД приближаются к норме. Эти данные свидетельствуют о том, что переохлаждение вызывает определенное нарушение и метаболизма железа. При этом расчетный суммарный уровень МДА в ОГ-2 на 11% выше расчетного уровня МПД. Это, в свою

очередь, говорит о том, что галармин все же повышает уровень антирадикальной защитной системы крови при гипотермии. В исследуемых тканях организма животных динамика изменения метаболизма АФК неодинакова. В печеночной и сердечной тканях наблюдается достоверное увеличение суммарного уровня Cu,Zn-СОД и Mn-СОД и цитохрома С, особенно уровня каталазы в печеночной ткани (причина этого увеличения, по-видимому, та же, что и в крови). В почечной и мозговой тканях тенденция изменения уровней СОД, каталазы и цитохрома С в ОГ-1 практически одинаковая (таблица). При гипотермии уровень аскорбатзависимой липидной пероксидации понижен. Исключение составляет печеночная ткань, в гомогенатах которой этот показатель заметно повышен. Интересен тот факт, что галармин в ОГ-2 во всех тканях проявляет регулирующий эффект. Это в основном выражается в приближении уровня каталазы к норме. При этом СОД практически не меняет свою активность в ОГ-2, однако уровень цитохрома С повышается в печеночной и почечной тканях, приближаясь в ней к контролю, и не меняется в мозговой ткани.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при переохлаждении ощутимо отличаются и митохондриальные дыхательные процессы с участием переносчика электрона – цитохрома С. Как правило, в ОГ-1 и ОГ-2 уровень липидной пероксидации снижен в сердечной, почечной и мозговой тканях, в которых уровень МДА заметно выше по сравнению с контрольными показателями. Видимо, основная нагрузка в регулировании метаболических путей с участием АФК приходится на кровь и печень. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что происходит ощутимое увеличение уровня перекиси водорода с соответственным повышением благодаря адаптационным механизмам организма уровня каталазы в печени. Вероятно, кровь и печень более чувствительны к оксидативным повреждениям, вызванным переохлаждением организма в приведенных условиях. Приближение уровня МДА в печеночной ткани к норме и снижение его относительно нормы в других тканях является избирательным воздействием галармина. Можно констатировать, что в большинстве случаев галармин проявляет антистрессорное воздействие при переохлаждении в приведенных режимах. Механизм воздействия галармина, по-видимому, связан со стимулированием иммунной защиты организма [16], хотя возможен и гормональный эффект. Антистрессорный эффект галармина при гипотермии может быть рекомендован для использования в качестве положительного фактора при переохлаждении.

Институт биохимии НАН РА

Государственный педагогический институт им. М.Налбандяна (Гюмри)

**Ա.Ե.Հարությունյան, Մերգ.Ս.Ալեքսանյան, Մ.Ա.Բաբայան, Ս.Ս.Ալեքսանյան,
Մ.Ա.Սիմոնյան, ակադեմիկոս Ա.Ա.Գալոյան**

Գալարմինի կարգավորիչ դերը հիպոթերմիայի ժամանակ

Առնետներին ցածր ջերմաստիճանում (-10°) 24 ժամ պահելու հետևանքով արյան մեջ և այլ հյուսվածքներում (լյարդ, երիկամ, սիրտ, ուղեղ) առաջ է գալիս բնութագրական օքսիդատիվ սթրես, ինչը արտահայտվում է նշված կենսահամակարգերում տեղակայված և թթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող մետաղապրո-

տեխնների և լիպիդային պերօքսիդացման մակարդակների համապատասխան շեղումներով: Մեկ ժամ առաջ մինչև կենդանիներին սառը պայմաններում պահելը ներմաշկային ներարկված գալարմինը (40 մկգ) մեծամասամբ մոտեցնում է նշված մետաբոլիտների էնդոգեն մակարդակները նորմային: Բացառություն են կազմում էրիթրոցիտային թաղանթային ցիտոքրոմ *b*₅₅₈*III*, տրանսֆերինը, որոշ չափով ցիտոքրոմ C-ն և մալոնային դիալդեհիդը, որոնց քանակները դեռես չեն կարգավորվում: Սրանով է արտահայտվում գալարմինի հակասթրեսային՝ կարգավորիչ դերը հիպոթերմիայի ժամանակ էքսպերիմենտում:

Литература

1. *Xu H., Yenari M.A., Steinberg G.K., Giffard R.G.* - J.Cereb.Blood Flow Metab. 2002. V. 22. P. 21-28.
2. *Abdul-Khaliq H., Schubert S., Troitzsch D.* - Acta Anaesthesiol.Scand. 2001. V.45. P. 696-701.
3. *Fukuhara T., Nishio S., Ono Y* - Brain Res. 1994. V. 657. P. 333-336.
4. *Shkesters A.P., Utno Lia, Girgensone Mia* - Bull.Eksp.Biol.Med. 1991. V.III, P. 593-595.
5. *Chan P.H., Yang G.Y., Chen S.F.* - Ann.Neurol. 1991. V.29. P. 482-486.
6. *Green C.J., Healing G., Lunce J.* - Transplantation, 1986. V.41. P. 161-165.
7. *Shlafer M., Kane P.F., Kirsh M.M.* - J.Thorac Cardiovasc.Surg. 1982. Y.83, P. 830-839.
8. *Hajjar G., Toledo-Pereyra L.H., Mackenze G.H.* - P.R.Helth Sci.J, 1986. V.5. P. 19-25.
9. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В.* - Арм. патент, Промышленная собственность, 1997. Т.1. С. 34.
10. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М.* - Лицензия изобр. N908. Арм. патент. 2001.
11. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* ПОЛ в биомембранах. М. Наука. 1972. 252 с.
12. *Симонян М.А.* - Открытия. Изобретения (СССР). 1988. N28. С.107.
13. *Симонян Г.М., Бабаян М.А, Симонян Р.М., Симонян М.А.* - Биол.ж. Армении. 1999. N1. С. 18-21.
14. *Sinet P.M., Garber P.* - Arch. Biochem. Biophys. 1981. V. 212. P. 68-72.
15. *Aladzhov E.* - Exp.Med.Morphol. 1987. V. 26, P. 39-41.
16. *Галоян А.* - Нейрохимия. 2001. Т. 18. N1. С. 83-95.