

УДК 539.166.612.599.322

Р. М. Симонян, К. Р. Григорян, Ш. А. Маркарян, М. А. Симонян

**Влияние диметилсульфоксида на уровень эндогенных
металлопротеинов крови интактных и облученных гамма-лучами
крыс**

(Представлено академиком А. А. Галояном 14/X 2002)

Диметилсульфоксид (ДМСО) широко используется в медицинской практике как фармацевтический препарат для лечения заболеваний, представляющих собой различные проявления оксидантного стресса, при этом препарат ДМСО димексид оказывает бактерицидное, противовоспалительное, сосудорасширяющее действие, изменяет проницаемость клеточных мембран, стабилизируя их, обладает криопротекторным воздействием [1-4]. ДМСО оказывает цитопротекторное и радиопротекторное действие [5] при облучении мышей смешанными радионуклеотидами [6]. Профилактическое введение ДМСО предотвращает понижение супероксиддисмутазной (СОД)-активности в печени мышей при гамма-облучении, понижая при этом липидную перекисную окисление [7]. Однако под воздействием гамма-лучей в водных растворах ДМСО образуются токсические для нуклеиновых кислот активные метилпероксильные радикалы [8]. Наряду с этим ДМСО снижает АТФазную активность в субмитохондриальных образованиях с подавлением гликолиза [9]. Механизм эффектов ДМСО связывается главным образом с его $\text{OH}^\bullet$ - улавливающей способностью [10,11], а эти радикалы, будучи высокоактивными, являются высокотоксичными для различных биосистем соединений, инициируют процесс липидной перекисной окисления биомембран, инактивируя многие ферменты, включая и СОД [12]. Для выявления механизмов воздействия ДМСО на гомеостаз не облученных и облученных гамма-лучами организмов целесообразно одновременно и комплексно определить сдвиги металлопротеинов крови (как чувствительный диагностический тест), продуцирующих и утилизирующих активные формы кислорода (АФК), без воздействия и под влиянием введенного в лечебном режиме ДМСО после различных доз облучения гамма-лучами (3.5 и 6.14 Гр), что и составляет цель работы.

Опыты проводились на белых половозрелых крысах-самцах (180-200 г), разделенных на пять групп по 10 животных в каждой. В контрольной группе (К) крысы получали внутривенно 0.9% хлористый натрий (0.5 мл) на 3 и 7 день опыта, в опытной группе-1 (ОГ-1) - 0.5 мл ДМСО по 40 мг/кг массы животного на 3 и 7 день эксперимента, в ОГ-2 и ОГ-3 животные были подвергнуты γ -облучению в дозе 3.5 и 6.14 Гр соответственно. В ОГ-4 и ОГ-5 животные получали по 40 мг/кг ДМСО на 3 и 7 дни после γ -облучения в дозе 3.5 и 6.14 Гр соответственно. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом на 15 день эксперимента. Кровь животных каждой группы собирали в отдельных сосудах, стабилизируя 2% раствором оксалата натрия.

Металлопротеины крови антиоксидантного действия (СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) и новые металлопротеины прооксидантного действия (суммарная фракция сывороточных цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} ; эритроцитарные мембранные цитохромы b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} , супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки - супрол с определением его супероксидпродуцирующей активности [13], а также цитохром b_5 - из растворимой фракции эритроцитов) получали одновременно по биотехнологическому способу [14], путем ионообменной хроматографии отдиализованных против воды сыворотки, белковой фракции плазматической части эритроцитов и солюбилизированной без использования детергента белковой фракции мембран эритроцитов [15] на отдельных колонках с целлюлозами ДЕ-52 и КМ-52 ("Whetman", Англия) и сефадексом ДЕАЕ А-50 ("Pharmacia", Швеция) и гель-фильтрации на биогеле Р-100 ("Reanal", Венгрия).

СОД-активность фракций и O_2^- -продуцирующую активность супрола определяли методом нитротетразолиевого синего путем вычисления процента понижения (в случае СОД) или прироста (в случае супрола) плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образовавшегося в результате восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим методом, рассчитав количество расщепляющейся перекиси водорода за 1 мин при 20° под воздействием определенного количества фракций. Удельные активности СОД и каталазы определяли в расчете на 1 мл эритроцитов, удельную O_2^- -продуцирующую активность супрола - в расчете на 1 мл сыворотки.

Количество металлопротеинов рассчитывали путем измерения величин характерных максимальных оптических поглощений, которые для цитохрома b_5 наблюдаются при 525 нм, цитохромов b_{558} - 530 нм (окисленная форма), ЦП - 610 нм, ТФ - 470 нм и супрола - 430 нм (слабое плечо). γ -облучение животных осуществляли на установке "РУМ-I" (СССР), с фильтрами Cu и Al-0.5 мм. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия), с длиной оптического пути 1 см при 20°C. Описанный эксперимент повторяли 4 раза; полученные результаты обрабатывали общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера.

Под влиянием ДМСО в крови интактных животных уровень металлопротеинов анти- и прооксидантного действия повышается, исключение составляет цитохром b_5 (таблица, ОГ-1). В этой группе повышение уровней O_2^- -продуцирующих металлопротеинов происходит не на фоне адекватного повышения уровней утилизирующих O_2^- (других АФК) антиоксидантного действия металлопротеинов. При этом заметно увеличиваются уровни эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} , O_2^- -продуцирующая активность супрола и уровень ТФ. Уровни же ЦП, каталазы, супрола и суммарной фракции сывороточных цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} , а также СОД повышаются незначительно. Можно констатировать, что под

воздействием ДМСО в интактных организмах происходит стимулирование аэробных метаболических процессов с участием АФК.

В ОГ-2 на фоне понижения уровней прооксидантного действия металлопротеинов (цитохромы b_5 , b_{558}^I и b_{558}^{II} , супрол) и антиоксидантных металлопротеинов (СОД и особенно каталаза) происходит повышение уровней эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} , ЦП, ТФ и O_2^- - продуцирующей активности супрола. При увеличении дозы облучения (ОГ-3) происходит общее снижение уровней как прооксидантного, так и антиоксидантного действия металлопротеинов, хотя уровень ЦП практически не меняется, а уровень каталазы даже заметно повышается. ДМСО в лечебном режиме в ОГ-4 приводит к некоторому повышению уровней цитохрома b_5 , сывороточных цитохромов b_{558}^I , b_{558}^{II} и ТФ, хотя уровни остальных цитохромов b_{558} , ЦП, СОД и каталазы продолжают снижаться. В ОГ-5 происходит заметное увеличение уровней цитохрома b_5 , супрола (его O_2^- - продуцирующей активности), ЦП, ТФ, СОД и каталазы, однако уровни сывороточных и эритроцитарных цитохромов b_{558} остаются ниже нормы. При этом положительный регулирующий эффект ДМСО в ОГ-5 более ощутим, чем в ОГ-4.

Уменьшение уровня цитохрома b_5 в ОГ-1 скорее всего есть результат повышения подвижности животных под воздействием ДМСО (при гипокинезии происходит резкое повышение уровня цитохрома b_5). Понижение уровня сывороточных цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} (особенно при гамма-облучении 6.14 Гр), видимо, связано с повышением их расходования в процессе "обуздания" токсического воздействия перекиси водорода на различные биосистемы плазмы. Сывороточные цитохромы b_{558} , особенно цитохромы b_{558}^{II} из сыворотки крови крыс, проявляют высокую резистентность против H_2O_2 , по сравнению с другими цитохромами, более того, защищают биосистемы от деградирующих эффектов перекиси водорода не путем ее расщепления, как это делает каталаза, а путем "экранирования" перекиси [16]. При увеличении дозы облучения в результате радиолиза образуются АФК, в частности O_2^- , продуктом ферментативного дисмутирования которого является перекись водорода [12]. Видимо, из-за этого в ОГ-3 соответственно увеличивается уровень каталазы. С другой стороны, в ОГ-2-4 в условиях начинающейся анемии, наряду с уменьшением уровня гемоглобина, уменьшаются уровни и других металлопротеинов - участников метаболических процессов переноса электрона, в частности, в эритроцитах (цитохром b_5 , СОД, каталаза, уровень последнего, как отмечалось, заметно выше только в ОГ-3). В ОГ-2 повышение уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} скорее всего связано с повышением уровня липидной пероксидации в этих мембранах, в результате чего могут расщепляться гидрофобные связи, ответственные за удержание этих гемопротеинов в соответствующих местах мембран (это облегчает выброс цитохромов b_{558} из мембран эритроцитов в растворимую фазу). В ОГ-3 уменьшение уровня цитохромов b_{558} из мембран эритроцитов свидетельствует об ощутимом истощении организма и потере стабильности мембран

эритроцитов, новыми структурно-функциональными элементами которых являются цитохромы b_{558} различных типов [17]. Аналогичного типа цитохромы b_{558} локализованы в мембранах различных биосистем, в частности, в мембранах форменных элементов плазмы, и в основном являются НАДРН-зависимыми O_2^- - продуцирующими системами [18].

Увеличение O_2^- - продуцирующей активности супрола в ОГ-2-4 с уменьшением его уровня может быть, с одной стороны, связано с активированием этого НАДРН-содержащего липопротеина сыворотки высокой плотности нового типа *in vivo* [19], с другой - с увеличением его расходования путем перекисного окисления собственных фосфолипидных остатков (этот процесс может усиливаться продуцируемыми самим супролом O_2^- , которые наряду с гидроксильными радикалами $OH^\bullet$ также инициируют липидную пероксидацию) [13].

Изменение уровней ЦП и ТФ свидетельствует об определенном нарушении метаболизма меди и железа во всех группах. Уменьшение уровня СОД после гамма-(рентгеновского) облучения связано не только с повышением ее расходования, но и с обратимым восстановлением Cu^{2+} в активном центре фермента супероксидными радикалами или перекисью водорода как *in vitro*, так и *in vivo*; при таком облучении и вводимая СОД имеет защитную компенсаторную функцию [20]. Снижение уровня СОД в ОГ-2-4, видимо, также происходит по аналогичному механизму. С другой стороны, ДМСО, являясь скаведжером $OH^\bullet$ радикалов, так или иначе предотвращает дезактивацию Cu , Zn -СОД, хотя в апротонной среде ДМСО заменяет молекулы воды в активном центре фермента и необратимо изменяет нативную конформацию его активного центра и несколько дезактивирует этот фермент [20]. Поскольку ДМСО имеет высокую проницаемость через различные биомембраны [3], включая и эритроцитарные, не исключается и непосредственное его воздействие на СОД, локализованную в эритроцитах. Эти эффекты ДМСО необходимо учитывать при его использовании в медицинской практике, в частности, в качестве радиопротектора.

Под воздействием ДМСО в указанном режиме оптические спектры ЦП, ТФ, цитохромов b_5 , b_{558} и супрола ощутимых качественных изменений не претерпевают *in vivo*, что является немаловажным аргументом в пользу ДМСО как фармацевтического препарата.

Можно констатировать, что в течение пятнадцатидневного постоблученного периода адаптационные механизмы организма энергичнее противодействуют более повышенным дозам рентгеновского облучения (6.14 Гр), чем меньшим (3.5 Гр). Изменение метаболизма АФК под воздействием ДМСО у интактных и облученных животных происходит неадекватным образом, что вызывает соответствующий дисбаланс между уровнями продуцирующих и утилизирующих O_2^- - металлопротеинов. Это является основным фактором оксидативного повреждения крови при гамма-облучении в различных дозах в период коренных изменений гомеостаза (в течение первых 15 дней после облучения).

Радиорезистентность организма под воздействием ДМСО связана не только со стабилизацией эритроцитарных мембран, но и с повышением уровней ключевых металлопротеинов антиоксидантного действия (СОД, каталаза, ЦП и ТФ), утилизирующих,

нейтрализующих АФК различными механизмами.

Относительные сдвиги уровней эндогенных металлопротеинов крови интактных и облученных гамма-лучами (3.5 и 6.14 Гр) крыс в отсутствие и под воздействием ДМСО по сравнению с контрольными показателями, которые принимаются за 100% (n=4, P < 0.05)

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2	ОГ-3	ОГ-4	ОГ-5
Цитохром b ₅	-24.1±2.2	-12.5±1.4	-27.8±3.5	-12.6±1.6	+9.2±1.1
Суммарная фракция цитохрома b ₅₅₈ ^I и b ₅₅₈ ^{II}	+2.5±0.4	-16.7±2.1	-63.2±5.4	-10.1±1.3	-31.6±3.3
			P < 0.01		
Цитохром b ₅₅₈ ^{III}	+16.3±2.4	+51.5±5.2	-21.8±2.0	-54.1±7.2	-16.4±1.6
		P < 0.02			
Цитохром b ₅₅₈ ^{IV}	56.1±7.7	+52.0±5.8	-4.0±0.3	-50.5±6.9	-48.7±5.4
Супрол	+5.5±1.2	-79.2±8.0	66.7±4.9	-65.8±6.1	+32.2±3.6
O ₂ ⁻ - продуц. активность супрола	+109.6±7.9	+120.4±10.2	9.5±1.1	+133.4±15.3	+76.0±5.4
				P < 0.04	
ЦП	+2.2±0.2	+50.0±4.7	+4.1±0.3	-25.1±2.3	+40.0±4.9
Cu, Zn-СОД	+11.6±1.9	-14.5±1.2	-2.0±0.2	-14.5±2.1	+3.8±0.1
ТФ	+23.8±2.6	+46.6±5.1	+14.3±1.2	+26.6±2.9	+71.4±8.0
Каталаза	+2.4±0.3	-44.1±4.6	+50.0±5.1	-23.4±2.2	+27.0±5.1
			P < 0.01		

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА
Ереванский государственный университет

Литература

1. Компанцева Е. В., Гаврилин М. В., Сеньчукова Г. В. и др.-Лекарственные препараты. 2000. Т.34. С. 53-54.
2. Брилль Г. Е., Захаров Е. И.-Эксп. клин. фармакол. 1998. Т.61. С. 54-56.
3. Jacob S. V., Herschler R.-Cryobiology. 1986. V.23. P. 14-27.
4. Веселовский В. П., Богоявленский И. Ф., Сергеев В. П. Применение димексида в медицине. Л. 1998.
5. Ashwood-Smith M. J.- Ann. N. - Y Acad. Sci. 1967. V.4. P. 41-62.
6. Goddu S. M., Narra V. R., Harapanhali R. S. -Acta oncol. 1996. V.35. P. 901-907.

7. *Ueda T., Toyoshima Y., Kushihiushi T., Hishida H.-J.* Toxcicol. Sci. 1993. V.18. N4. P. 239-249.
8. *Milligan J. R., Ng J. Y., Wu C. C. et al.* -Radiat. Res. 1996. V.146. P. 436-443.
9. *Gosh A.K., Iti T., Gosh S., Sloviter H. A.* -Biochem. Pharmacol. 1976. V.25. P. 1115-1117.
10. *Гуляева Н. В.-Ж.* высш. нервн. деятельн. им. И. П. Павлова. 1987. Т.37. N2. С. 356-358.
11. *Panganamala R. V., Sharma H. M., Lleikkila R. F.*-Prosataglandins. 1976. V.11. P. 599-607.
12. *Fridovich I.*-Ann. Rev. Biochem. 1995. V. 64 P. 97-112.
13. *Симонян М. А., Карапетян А. В., Бабаян М. А., Симонян Р. М.*-Биохимия. 1996. Т.61. N5. С. 932-938
14. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Мелконян Р. В.* Лицензия изобр. N341. Армпатент. 1997. Ереван.
15. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Григорян Г. Г., Симонян Р. М.* Лицензия изобр. N908. Армпатент. 2001. Ереван.
16. *Симонян Г. М., Григорян Г. Г., Симонян Р. М., Симонян М. А.* В сб.: Актуальные вопросы военной медицины. Ереван. Гос. мед. ун-т. 1999. С. 48-61.
17. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Бабаян М. А.*- Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1977-1987.
18. *Batot G., Paclet M. H., Dousierre J. et all.*-Biochem. Biophys. Acta. 1998. P. 1406-1412.
19. *Симонян Г. М., Бабаян М. А., Симонян Р. М., Симонян М. А.*- Биол. журн. Армении. 1999. Т. 52. С. 18-21.
20. *Симонян М. А.* Автореф. докт. дис. Ереван. НАН РА. 1996.

Ռ. Մ. Սիմոնյան, Կ. Ռ. Գրիգորյան, Շ. Ա. Մարգարյան, Մ. Ա. Սիմոնյան

Դիմերթիլսուլֆօքսիդի ազդեցությունը ինտակտ և գամմա-ճառագայթահարված առնետների արյան մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակի վրա

Բուժական նպատակով ներարկված դիմերթիլսուլֆօքսիդի (ԴՄՍՕ) ազդեցության ներքո (ԴՄՍՕ-ն տրվում է ներորովայնային ներարկումով՝ 40 մգ/կգ չափաքանակով փորձի 3-րդ և 7-րդ օրը) հիմնականում դիտվում է ինտակտ առնետների արյան հակաօքսիդային և պրօօքսիդային գործողության մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների աճ: Հիմնականում դրանք մոտենում են ստուգիչ չափանիշներին՝ 3.5 և հատկապես 6.14 Գր դոզաներով գամմա-ճառագայթումից հետո: