ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Том 107 2007 № 3

БИОХИМИЯ

УДК 577.152.1 + 171.3 + 616.61

А. С. Алексанян, М. А. Бабаян, академик А. А. Галоян, М. А. Симонян

Механизмы токсического воздействия гентамицина и положительный эффект богатого пролином полипептида при гентамицин-индуцированном нефротоксикозе крыс

(Представлено 30/X 2006)

Ключевые слова: *гентамицин, нефротоксикоз, ткань, металлопротеины, БПП-1*

Известный антибиотик гентамицин вызывает нефротоксикоз у крыс с усилением тубулярного некроза почек 3-й и 4-й степени, увеличивая при этом экспрессию нитрит оксид синтазы на фоне активации фактора некроза каппа-В, селективные ингибиторы которого (пиролидин дитиокарбамат и сульфосалазин) оказывают защитный эффект [1]. Однако молекулярно-биохимические механизмы воздействия гентамицина на свойства металло-протеинов антиоксидантной и прооксидантной активности крови и органов иммунной системы (селезенка, тимус и костный мозг) in vitro, ex vivo и in vivo остаются еще невыясненными. Это объясняется тем, что металлопротеины (МП), особенно МП прооксидантной активности (МПА): изоформы цитохрома b558 (gp91, p22, p67 и p47 phox) сыворотки крови, эритроцитарных мембран, а также цитозоля и мембран клеток органов иммунной системы - являются ключевыми компонентами соответствующих НАДРН-зависимых оксидаз, которые локализованы в основном в мембранах форменных элементов плазмы для продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) при активном фагоцитозе [2,3]. С другой стороны, в составе молекулы цитохрома (цит) b558 обнаружен эндогенный богатый пролином пептид [4], а экзогенный синтетический аналог богатого пролином полипептида из нейросекреторных гранул нейрогипофиза (БПП-1) оказывает антистрессорный и иммуномодуляторный эффекты [5] и по предварительным результатам стимулирует метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность новых изоформ цит b558 из мембран клеток

(МК) органов иммунной системы и эритроцитарных мембран (ЭМ) [6]. Целью работы являлось определение количественных и качественных изменений МП крови, селезенки, костного мозга и тимуса под воздействием гентамицина in vitro, ex vivo и in vivo и воздействие экзогенно введенного БПП-1 на эти показатели при гентамицин-индуцированном нефротоксикозе.

В первой серии экспериментов было определено влияние гентамицина (фирма "Sopharma", Болгария) концентрации 10 мг/мл на уровень МП антиоксидантной активности (МАА) (Cu,Zn-СОД и каталаза из цитозоли эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) и МПА (супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки - супрол, цит b5 из цитозоли эритроцитов, новые изоформы цит b558 ЭМ - цит b558III, цит b558IV и сыворотки - цит b558I, цит b558II и цит b558 мембран клеток органов иммунной системы - селезенки, костного мозга и тимуса) после 48 ч инкубации гентамицина с МАА и МПА при 4° в аэробных условиях in vitro.

Во второй серии эксперимента было определено влияние гентамицина (10 мг/мл) на кровь и МК селезенки (МКС), мембран клеток костного мозга (МККМ) и мембран клеток тимуса (МКТ) (по 20 мл) после инкубации в течение 5 суток при 4° в аэробных условиях ex vivo, с дальнейшим выделением из этих источников МАА и МПА и определением их уровня и активности. В третьей серии экспериментов белые крысы обоих полов массой 220-250 г были разделены на три группы (по 10 крыс): животные первой опытной группы (ОГ-1) получали внутрибрюшинно (в/б) по 100 мг гентамицина ежедневно в течение 10 дней [1]. Животные ОГ-2 наряду с гентамицином через каждые три дня получали по 20 мкг БПП-1 также в/б. Животным контрольной группы в аналогичном режиме давали физраствор. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом, забирали органы (селезенка, костный мозг, тимус и кровь). МАА и МПА выделяли и очищали биотехнологическим способом, без использования детергента [7,8], с небольшим видоизменением. Использовали гомогенаты тканей в 0.04 М калий фосфатном буфере (КФБ). Далее промывали ЭМ и МК. Часть (по 10 мл) мембран оставляли для определения активности МП в гетерогенной фазе (непосредственно в этих мембранах). Основная масса крови и МК были использованы для получения МАА и МПА.

СОД активность фракций и O_2^--продуцирующую активность супрола и изоформ цит b558 из указанных источников определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом, путем подсчета процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола или цит b558) образования формазана (при 560 нм), в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием растворов перекиси водорода в отсутствие и присутствии оп-

ределенного количества каталазной фракции. МетHb-восстанавливающую активность цит b558 (в гомогенной и гетерогенной фазах) определяли кинетическим методом [6], путем регистрирования снижения плотности альфа-полосы поглощения ферриHb при 565 нм (это снижение прямо пропорционально увеличению плотности поглощения образовавшегося ферроHb при 555 нм) в течение 1-1.5 ч, после предварительной инкубации реакционной смеси в течение 18-20 ч при 30°. Количество МАА и МПА определяли путем измерения плотности характерного максимального оптического поглощения: для изоформ цит b558 при 530 нм, цит b5 - 525, супрола - 430, ТФ - 470, ЦП - 610 нм. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

В первой серии экспериментов 48-часовое инкубирование очищенных МП с гентамицином в аэробных условиях in vitro вызывает неадекватные изменения уровня и активности этих МП (табл. 1). Практически не изменяются уровни (плотности поглощений при 530 нм) цит b558I, b558II, b558III и b558IV. Однако несколько снижается НАДРН-зависимая O_2^--продуцирующая активность цит b558III в гомогенной и гетерогенной фазах и резко снижается метHb-восстанавливающая активность этого гемопротеина. При этом под воздействием гентамицина величина оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{530}) цит b558III увеличивается на 21-24%. Таким образом, механизм потери метHb-восстанавливающей активности цит b558 гентамицином связывается с изменением его плотности поглощения Соре (при 412 нм) с соответственным изменением нативности хромофорной группы этого гемопротеина ЭМ. Незащищенность новых изоформ цит b558 МК органов иммунной системы от гентамицина более выраженна. В приведенных условиях гентамицин резко (до 301.8%) снижает плотность оптического поглощения фракции цит b558 МКС и вызывает необратимую агрегацию этого гемопротеина с потерей его НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей и метHb-восстанавливающей активности. Существенно снижаются эти показатели и у фракции цит b558 МККМ и МКТ. Сам гентамицин обладает приблизительно 0.1%-ной СОД-миметической активностью и снижает уровень продуцированных супролом O_2^-, что положительно влияет на стабильность этого липопротеина сыворотки высокой плотности, играющего определенную роль в сохранении вязкости сыворотки и в целом крови. Гентамицин вызывает обратимую агрегацию каталазы, хотя ее активность мало снижается (табл. 1). Существенных изменений уровня и активности других МАА в результате инкубирования гентамицина in vitro не наблюдается. Фактически в результате непосредственного воздействия гентамицина в первую очередь подвергаются

деградации представители МПА, прежде всего цит b558 МК органов иммунной системы.

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня и активности МАА и МПА крови и МК селезенки, тимуса и костного мозга под воздействием гентамицина после их инкубирования в течение 48 ч (in vitro) и 5 суток (ex vivo) по сравнению с 100% контрольными показателями в отсутствие гентамицина, $P < 0.05$, $n = 8$

МП, активность	In vitro	Ex vivo
Цит b5	-3.3±0.4	-8.8±1.4
Цит b558I + b558II	-2.1±0.2	-11.4±1.3
Цит b558III	+2.4±0.1	-4.4±0.2
Цит b558IV	+1.9±0.2	-7.1±0.4
Цит b558 МКС	-301.8±24.7	-94.3±7.5
Цит b558 МККМ	-42.4±3.6	-25.9±2.2
Цит b558 МКТ	-48.2±5.5	-26.1±3.0
O_2^--продуцирующая активность цит b558III в гомогенной фазе	-18.6±4.0	-18.2±4.1
O_2^--продуцирующая активность цит b558III в гетерогенной фазе	-11.4±1.8	-14.1±2.4
MetHb-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе	-89.8±4.3	-51.3±4.8
MetHb-восстанавливающая активность цит b558III в гетерогенной фазе	-64.3±2.1	-47.4±3.3
Супрол	+31.3±2.9	+51.4±5.6
O_2^--продуцирующая активность супрола	-48.4±3.7	-24.4±3.1
ЦП	-8.8±1.6	-41.3±5.2
ТФ	+2.4±0.2	+8.4±0.5
Cu,Zn-СОД	+10.2±0.2	+17.3±2.4
Каталаза	-14.3±1.6	-26.1±2.4

Примечание. Гентамицин подавляет метHb-восстанавливающую активность цит b558 МК селезенки, костного мозга и тимуса (29.5-57.6 %) in vitro.

Во второй серии экспериментов в результате инкубации гентамицина с кровью, МК исследуемых органов ex vivo с дальнейшим выделением из них МП направленность изменений уровня и активности МП практически сохраняется. Однако диапазон этих изменений отличается у МАА и МПА (табл. 1). Таким образом, гентамицин свободно проникает через ЭМ и МК

органов иммунной системы и в основном отрицательно влияет на состояние МПА и некоторых МАА (каталаза и ЦП). В третьей серии экспериментов гентамицин вызывает нефротоксикоз крыс [1], который происходит на фоне характерных изменений уровня и активности МАА и МПА крови и МК клеток исследуемых тканей (табл. 2). При этом внутрибрюшинно введенный гентамицин снижает НАДРН-зависимую супероксидпродуцирующую и метНb-восстанавливающую активность цит b558 МКС, МККМ, МКТ и цит b558III ЭМ. Одновременно происходит снижение уровня супрола с некоторым повышением его супероксидпродуцирующей активности. Уровень МАА также снижается, за исключением ЦП и ТФ (как ответ адаптационных механизмов организма на воспалительные процессы, наблюдающиеся при нефротоксикозе [1,9]). Фактически механизмы повреждающих эффектов гентамицина связаны с непосредственным воздействием на МАА и МПА не только in vitro и ex vivo, но in vivo. Это свидетельствует о том, что этот антибиотик, нейтрализуя антигены, имеет свободный доступ через МК и ЭМ, оказывая отрицательное воздействие в первую очередь на цит b558 МК органов иммунной системы. Более того, цит b558 являются компонентами НАДРН-зависимых оксидаз в процессе продуцирования O_2^- при активном фагоцитозе [3]. Можно констатировать, что путем денатурирования цит b558 гентамицин отрицательно влияет на иммунную защиту организма. Трехкратное внутрибрюшинное введение БПП-1 играет положительную роль в процессе регулирования уровня МПА и МАА в крови и органах иммунной системы (табл. 2). Это отражается и на снижении гибели животных при гентамицин-индуцированном нефротоксикозе (гибель животных в отсутствие БПП-1 составляла 31.3±5.4%, а после в/б введения БПП-1 - 9.6±1.1%). Механизм положительного эффекта БПП-1 при нефротоксикозе в основном связан с тем, что в приведенных количествах этот полипептид стимулирует метНb-восстанавливающую активность вышеуказанных изоформ цит b558 путем улавливания высокоактивных гидроксильных радикалов, которые деградируют как МАА, так и МПА [9-11].

Таким образом, гентамицин, являясь антибиотиком, нейтрализующим антигены, отрицательно влияет на ключевые компоненты иммунной защиты - цит b558 МК селезенки, костного мозга и тимуса, а также ЭМ и на некоторые МАА при нефротоксикозе крыс iv vitro, ex vivo и iv vivo, а БПП-1 оказывает антистрессорный, протективный эффект. Эти данные могут явиться научной основой для переоценки целесообразности применения гентамицина в клинике.

Таблица 2

Относительное изменение уровня и активности МПА и МАА крови и МК селезенки, тимуса и костного мозга при нефротоксикозе крыс под воздействием внутрибрюшинно введенного гентамицина и в отсутствие и под воздействием внутрибрюшинно введенного БПП-1 по сравнению со 100 % контрольными показателями ($P < 0.05$, $n = 8$)

МП, активность	Гента-мицин	Гентами-цин+БПП-1
1	2	3
Цит b5	-19.2±2.1	-14.8±3.3
$\sum$ цит b558I + b558II	-25.3±2.9	+ 12.5±1.6
Цит b558III	-32.7±4.2	-11.4±1.2
Цит b558IV	-14.9±2.3	-6.8±0.3
O_2^--продуцирующая активность цит b558III в гомогенной фазе	-24.1±3.0	-8.6±0.4
O_2^--продуцирующая активность цит b558III в гетерогенной фазе	-18.4±2.6	-10.1±2.2
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МКС в гомогенной фазе	-27.6±3.3	-19.2±1.3
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МКС в гетерогенной фазе	-37.8±2.5	-11.7±0.7
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МККМ в гомогенной фазе	-21.5±1.8	-16.7±3.0
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МККМ в гетерогенной фазе	-12.8±1.6	- 10.4±0.2
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МКТ в гомогенной фазе	-16.7±2.7	- 14.8±1.5
O_2^--продуцирующая активность цит b558 МКТ в гетерогенной фазе	-26.8±4.0	- 21.9±3.4
MetHb-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе	-48.5±3.1	-12.8±1.4
MetHb-восстанавливающая активность цит b558III в гетерогенной фазе	-31.5±2.2	- 21.3±2.1
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МКС в гомогенной фазе	-81.3±3.9	- 56.8±5.0
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МКС в гетерогенной фазе	-63.2±4.4	- 23.8±5.1

1	2	3
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МККМ в гомогенной фазе	-39.7±5.0	- 21.7±3.6
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МККМ в гетерогенной фазе	-25.8±3.2	- 19.5±4.1
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МКТ в гомогенной фазе	-23.8±2.2	- 17.5±2.6
MetHb-восстанавливающая активность цит b558 МКТ в гетерогенной фазе	-16.9±2.7	- 11.8±2.4
Цит b558 МКС	-98.5±7.7	-65.8±3.3
Цит b558 МККМ	-32.3±2.2	-24.2±1.4
Цит b558 МКТ	-23.8±1.7	-19.2±4.1
Супрол	-26.7±2.8	-22.5±1.4
O_2^--продуцирующая активность супрола	+17.8±2.7	+13.1±1.3
Cu,Zn-СОД	-28.3±3.6	+8.1±0.7
Каталаза	-55.4±4.6	-19.8±4.0
ЦП	-32.8±3.4	-21.3±2.0
ТФ	-9.5±0.6	-6.7±0.5

Институт биохимии НАН РА им.Г.Х. Бунятяна

А. С. Алексанян, М. А. Бабаян, академик А. А. Галоян, М. А. Симонян

Механизмы токсического воздействия гентамицина и положительный эффект богатого пролином полипептида при гентамицин-индуцированном нефротоксикозе крыс

Нейтрализующий антигены антибиотик гентамицин оказывает отрицательный эффект на ключевые компоненты иммунной системы - новые изоформы цитохрома b558 из эритроцитарных мембран и мембран клеток органов иммунной системы (селезенка, костный мозг и тимус) и на активность некоторых антиоксидантных металлопротеинов in vitro, ex vivo и in vivo при гентамицин-индуцированном нефротоксикозе крыс. Внутрибрюшинно введенный богатый пролином полипептид оказывает антистрессорный эффект.

Полученные результаты дают основание для переоценки целесообразности применения гентамицина в клинике.

Ա. Ս. Ալեքսանյան, Մ. Ա. Բաբայան, ակադեմիկոս Ա.Ա.Գալոյան, Մ.Ա. Սիմոնյան

Գենտամիցինի թոքսիկ ազդեցության մեխանիզմները և պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի դրական դերը առնետների՝ գենտամիցինով հարուցված նեֆրոտոքսիկոզի ժամանակ

Գենտամիցինը հակաբիոտիկ է և կոչված է չեզոքացնելու անտիգենները: Այնուհանդերձ գենտամիցինը բացասականորեն է ազդում օրգանիզմի պաշտպանիչ համակարգի բաղադրամասերի՝ փայծաղի, թիմուսի և ոսկրածուծի բջջաթաղանթներից անջատված ցիտոքրոմ b558-երի նոր իզոձևերի, ինչպես նաև որոշ հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների վրա՝ in vitro, ex vivo և in vivo առնետների՝ գենտամիցինով հարուցված նեֆրոտոքսիկոզի ժամանակ: Ընդ որում պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդը ապտուում է հակաստրեսային դեր:

Սպացված արդյունքները հիմք են տալիս վերագնահատելու գենտամիցինի՝ կլինիկայում օգտագործելու նպատակահարմարությունը:

A. S. Alexanyan, M. A. Babayan, academician A. A. Galoyan, M. A. Simonyan

Mechanisms of Toxic Effect of Gentamicin and Positive Role of Proline-Rich Polypeptide at Gentamicin Induced Nephrotoxicosis of Rats

Gentamicin as an antibiotic, which neutralizes the antigens, has negative influence on the key components of immune system - new isoforms of cytochrome b558 from erythrocytes membranes and cell membranes of the immune system organs (spleen, thymus, bone marrow) and on the activity of some antioxidative metalloproteins in vitro, ex vivo and in vivo at gentamicin-induced nephrotoxicosis of the rats. Intraperitonealy injected proline- rich polypeptide indicates the antistressor effect.

On the base of these results it is necessary to revalue the expediency of the usage of gentamicin in clinics.

Литература

1. *Togcu O., Ozbek E., Tasci A.I.* - BJU Int. 2006. V. 98. N 3. P. 680-686

2. *Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М.* - Биохимия. 1995. Т. 60. N 12 С. 1977-1987.

3. *Vignais P.V.* - Cell Mol. Life Sci. 2002. V. 59. N 9. P. 1428-1459.

4. *Ogura K., Nubuhisa Y., Yazawa S. et al.* - J. Biol. Chem. 2006. V. 281. N 6. P. 3660-3668.

5. *Galoyan A.A.* Brain neurosecretory cytokines: Immune response and neuronal survival. 2004. Kluwer Academic plenum publishers. N. Y. 188 p.

6. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A.* - NAS RA Electronic J., Natural Sciences. 2006. V. 2. N 7. P. 3-6.

7. *Симонян М.А., Симонян Г.М.* Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. N 341 Армпатента. Ереван. 2001.

8. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М.* Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. N 908 Армпатента. Ереван. 2001.

9. *Мжельская Т.И.* - Бюлл. эксп. биол.мед. 2000. Т. 130. N 8. С. 124-132.

10. *Fridovich I.* - Annu Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 97-112.

11. *Potapovich M.V., Eremin A.N., Metelitsa D.I.* - Pricl. Biokhim. Microbiol. 2003. V. 39. N 2. P. 160-166.