

СИНТЕЗ БЕЛКА В УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СИНДРОМЕ ДЛИТЕЛЬНОГО РАЗДАВЛИВАНИЯ

Г.Ф.Хачатрян, А.Г.Геворкян, Д.Л.Барсегян, Г.А.Геворкян

*/Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА/
375014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: синдром длительного раздавливания, синтез белка, печень, почки, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, цитозоль

Синдром длительного раздавливания (СДР) сопровождается серьезными сдвигами в составе электролитов, выбросом в кровь токсических метаболитов, изменением pH спинномозговой жидкости. Данные литературы свидетельствуют, что при СДР повышается содержание миоглобина и уровня креатинкиназы (выше нормы на 10000 ед/л) [9]. Для спасения жизни таких больных необходимы мероприятия по очистке крови, способствующие снижению активности ферментов и миоглобина. В связи с этим нами была поставлена задача исследовать синтез белка в субклеточных структурах печени, селезенки и легких методом включения радиоактивного предшественника ^{14}C -лейцина.

Известно, что восстановление кислотности спинномозговой жидкости стимулирует регенерацию поврежденных аксонов у крыс [4]. На культуре астроцитов показано, что кислотный pH инициирует резкое увеличение их иммунореактивности [6] путем активного захвата ионов Ca и калпаина I [3]. Проведение гемодиализа больным после СДР дает положительные результаты лишь при длительном применении (более чем 2 месяца). Было показано, что один из изоферментов NO синтазы индуцируется ферментами цикла мочевины и что наибольшая индукция отмечена в почках, легких, печени и селезенке [5]. В свою очередь, NO индуцирует вазодилатацию капилляров, провоцирующую гиперперфузию мышц, которая отягощается гиповолемическим шоком [2].

Цель данного исследования заключается в изучении распределения синтеза белка между субклеточными образованиями — эндоплазматическим ретикулумом (ЭР), митохондриями (МХ) и цитозолем клеток печени и почек методом включения радиоактивного предшественника ^{14}C -лейцина.

Материал и методы

Эксперименты проводились на 72 беспородных крысах-самцах массой 160–200 г. СДР вызывали путем раздавливания мягких тканей бедра на специальном прессе с силой 100 кг на 1 кг массы животного с продолжительностью 2 и 5 ч. Животные были разделены на группы: интактная, контрольная (через 2 и 5 ч раздавливания) и опытная — через 2, 4, 24 и 48 ч после раздавливания. За 60 мин до декапитации животным вводили ^{14}C -лейцин с удельной радиоактивностью $240 \text{ мКю}\cdot\text{ммоль}^{-1}$ в количестве $50 \text{ мКю}\cdot 100 \text{ г веса}^{-1}$. После декапитации исследуемые органы перфузировали в растворе $0,15 \text{ M KCl}$, гомогенизировали в $0,44 \text{ M}$ сахарозы + 1 mM ЭДТА и методом дифференциального центрифугирования получали внутриклеточные фракции. Чистоту полученных фракций проверяли электронно-микроскопически и энзиматически. Уровень включения радиоактивного предшественника в мембранные белки МХ и ЭР определяли после растворения в $0,5 \text{ N}$ растворе гуанидина (NEN, USA) очищенных фракций мембран с последующим просчитыванием на сцинтилляционном спектрометре SL-4221 (Roshe Bioelectronique Kontron, France) с применением жидкого сцинтиллятора на основе диоксана. Эффективность счета по ^{14}C составляла 95%. Данные выражали в распад·мин⁻¹·мг белка⁻¹. Абсолютную радиоактивность просчитывали методом внешней стандартизации. Белок определяли по Лорури с применением тест-наборов фирмы «Sigma» (USA). Статистическую достоверность вычисляли при помощи t-теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изучение белоксинтезирующей активности в клетках печени при СДР показало, что при 2 ч СДР на 54,3% снижается скорость синтеза белков растворимой фракции. Период 2 ч декомпрессии характеризуется продолжением снижения синтеза до 37,5% от интактной величины с последующей активацией с 4 до 48 ч декомпрессии (табл. 1). Наивысшая белоксинтезирующая активность зафиксирована в отношении мембранных белков ЭР клеток печени. При СДР эта активность снижается на 40,1%, продолжает снижаться через 2 ч декомпрессии (20% от интактного уровня), незначительно выравнивается через 4 ч и повышается через 24 и 48 ч декомпрессии, оставаясь ниже интактной величины.

Распределение синтеза белка мембранных белков МХ протекает подобно фракции ЭР. В этой фракции общий уровень синтеза в норме значительно ниже, однако при СДР и во все изученные периоды декомпрессии идентичны с ЭР.

В течение 5 ч СДР синтез белков цитозоля клеток печени нарушается не столь существенно, как при 2 ч СДР, составляя 40,7%. Однако посткомпрессионный период начинается более интенсивным подавлением синтеза, которое доходит до 78% (табл. 2), хотя дальнейшие сроки декомпрессии (4–48 ч) отличаются интенсификацией синтеза белка, достигающей интактных величин, а при 24 ч даже превышающий этот уровень на 52%.

Таблица 1

Скорость синтеза белка в субфракциях клеток печени при 2 ч СДР
и в разные сроки декомпрессии

Субфракция	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа (декомпрессия)			
			2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Цитозоль	29968 ± 413	13709 ± 572 $P_1 < 0,001$	11254 ± 445	20302 ± 1139	19312 ± 1422	20047 ± 796
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,025$	$P_2 < 0,005$	$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,001$
Эндоплазматический ретикулум	51462 ± 1136	30802 ± 1595 $P_1 < 0,001$	10318 ± 303	14268 ± 1503	34812 ± 1994	31618 ± 581
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 > 0,05$	$P_2 > 0,05$
Митохондрии	37142 ± 1430	33519 ± 197 $P_1 < 0,05$	10891 ± 729	14827 ± 1153	39807 ± 3481	9162 ± 242
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,5$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 > 0,1$	$P_2 < 0,001$

Здесь и в последующих таблицах: $n = 6$; P_1 — разница между интактными животными и с СДР; P_2 — разница между контролем и декомпрессией
Данные выражены в распад $\cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$

Таблица 2

Скорость синтеза белка в субфракциях клеток печени при 5 ч СДР
и в разные сроки после декомпрессии

Субфракция	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа (декомпрессия)			
			2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Цитозоль	29968 ± 413	17768 ± 1301 $P_1 < 0,001$	6607 ± 593	31212 ± 1471	45577 ± 700	31163 ± 1989
			$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,4$	$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,5$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,005$
Эндоплазматический ретикулум	51462 ± 1136	34844 ± 2034 $P_1 < 0,001$	8548 ± 443	57051 ± 1023	43192 ± 1041	30550 ± 240
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,025$	$P_1 < 0,005$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,025$	$P_2 > 0,05$
Митохондрии	37142 ± 1430	23701 ± 4239 $P_1 < 0,025$	8893 ± 437	36257 ± 1378	19823 ± 301	18622 ± 357
			$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,5$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,05$	$P_2 < 0,001$	$P_2 > 0,2$	$P_2 > 0,2$

Мембранные белки ЭР при 5 ч СДР снижают активность синтеза до уровня зафиксированной при 2 ч СДР, однако 2-часовая декомпрессия после 5 ч СДР отличается более значительным подавлением белоксинтезирующей активности. В этом случае ингибирование синтеза составляет 83,4% с резким активированием через 4 ч (567% по сравнению с 2-часовой декомпрессией), уровень которого превалирует даже над интактным с дальнейшим линейным снижением.

Синтез белков мембран МХ печени при 5 ч СДР снижается на 26,2%, а после 2 ч декомпрессии снижение составляет 76,1%. Однако уже через 4 ч декомпрессии скорость синтеза белка митохондриальных мембран выравнивается с интактной с последующей инактивацией до 49% от исходной (через 24 и 48 ч декомпрессии).

Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что через 2 ч после СДР скорость синтеза белка в цитозоле почек снижается на 37,8%. Через 2 ч после декомпрессии скорость синтеза активируется на 40,5% по сравнению с контрольной группой (2 ч СДР) и на 24,2% — по сравнению с интактной группой животных, достигая максимальной скорости через 4 ч декомпрессии (соответственно на 54,4 и 37,9%). Через 24 ч после декомпрессии скорость синтеза белка начинает снижаться, однако по-прежнему остается высокой по сравнению с контрольной группой на 67,6% и на 29,1% — по сравнению с интактной группой животных, а через 48 ч достигает интактного уровня.

Таблица 3

Скорость синтеза белка в субфракциях клеток почек при 2 ч СДР и в разные сроки декомпрессии

Субфракция	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа (декомпрессия)			
			2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Цитозоль	24330±1027	17987± 649 $P_1 < 0,005$	30210±2142	39208±930	34325±1878	25048± 142
			$P_1 < 0,05$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,005$	$P_1 > 0,5$
			$P_2 < 0,005$	$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
Эндоплазматический ретикулум	25911±1491	17528 ± 234 $P_1 < 0,005$	10689 ± 238	21948±759	20384±1138	27553 ±545
			$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,05$	$P_1 < 0,05$	$P_1 > 0,2$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,005$	$P_2 < 0,05$	$P_2 < 0,001$
Митохондрии	22755± 541	21759 ± 447 $P_1 > 0,2$	12042 ± 435	15304± 655	21784±2477	20583±108
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$	$P_1 > 0,5$	$P_1 < 0,01$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$	$P_2 > 0,05$	$P_2 < 0,05$

Скорость синтеза белка мембран ЭР почек при 2 ч СДР снижается на 32,4%, продолжает снижаться в течение 2 ч после декомпрессии (на 58,7%), после чего резко повышается по сравнению с контролем через 4 и 24 ч после декомпрессии (на 20%) и сравнивается с интактным уровнем через 48 ч декомпрессии (табл. 3).

Мембранные белки МХ почек дольше сохраняют повреждающее действие СДР. Так, если при 2 ч СДР они практически не претерпевают изменений, то через 2 и 4 ч после декомпрессии эта величина снижается соответственно на 47 и 32,7%, а через 24 ч сравнивается с интактным уровнем скорости синтеза белка и продолжает оставаться нормальной через 48 ч.

Через 5 ч раздавливания наблюдается следующая закономерность синтеза белка в почках: резко усиливается скорость включения радиоактивного предшественника в белки цитозоля (на 37,8%), которая падает на 40,7% (по сравнению с контролем) и на 17,3% (по сравнению с интактными) через 2 ч декомпрессии, вновь усиливается через 4 ч и продолжает оставаться высокой через 24 и 48 ч декомпрессии (табл. 4).

Таблица 4

Скорость синтеза белка в субфракциях клеток почек при 5 ч СДР и в разные сроки декомпрессии

Субфракция	Интактная группа	Контрольная группа	Опытная группа (декомпрессия)			
			2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Цитозоль	24330±1027	33535±1530 $P_1 < 0,005$	19878±297 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,001$	43931±1712 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,005$	39135±138 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,025$	35704±1153 $P_1 < 0,001$ $P_2 > 0,1$
Эндоплазматический ретикулум	25911±1491	24974±4159 $P_1 > 0,5$	9867±349 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$	32672±582 $P_1 < 0,01$ $P_2 > 0,1$	29091±157 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,1$	17555±232 $P_1 < 0,005$ $P_2 > 0,1$
Митохондрии	22755±541	23013±3271 $P_1 > 0,5$	7802±225 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,005$	28920±745 $P_1 < 0,025$ $P_2 > 0,1$	29356±118 $P_1 < 0,001$ $P_2 > 0,1$	13791±367 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$

Мембранные белки ЭР при 5 ч СДР не претерпевают изменений, однако через 2 ч после декомпрессии резко (на 61,9%) снижаются, столь же резко повышаются через 4 и 24 ч и снижаются через 48 ч декомпрессии.

Одинаковая с ЭР закономерность в сдвигах скорости белкового синтеза при СДР наблюдается и в отношении мембран МХ (табл. 4). Однако через 2 ч декомпрессии снижение белоксинтезирующей активности мембран МХ более резко выражено. В этом случае оно составляет лишь 34,3% от интактного уровня. В дальнейшем идет нарастание активности, которая незначительно превалирует над интактным уровнем и снижается на 39,4% через 48 ч декомпрессии.

Обобщая изложенный материал, можно заключить о разнонаправленном повреждающем действии СДР на белоксинтезирующий аппарат клеток. Так, 2- и 5-часовое СДР проявляют порой диаметрально противоположное воздействие.

Действие СДР (2 и 5 ч) на клетки печени проявляется в подавлении тотального синтеза белка на 65,8%. При отсутствии изменений в уровне синтеза мембранных белков ЭР и МХ это снижение обусловлено распадом белков цитоплазмы. Через 2 ч декомпрессии тотальный белок снижается в 2,4 раза за счет снижения втрое синтеза белков ЭР и МХ. Если

учесть тот факт, что 90% белков МХ и все белки ЭР синтезируются в цитозоле, можно утверждать о резком подавлении цитоплазматического синтеза белка, который значительно активизируется через 4 ч, почти удваивается через 24 ч и начинает подавляться через 48 ч декомпрессии. По всей вероятности, при СДР и в начальные сроки декомпрессии включаются мощные компенсаторные механизмы, которые к концу вторых суток истощаются, чем и обусловлено снижение скорости синтеза белка. Почти идентично протекает синтез белка при 5-часовом СДР с более заметной активацией через 4 ч декомпрессии.

В отношении почек прослеживается следующая закономерность: через 2 ч СДР происходит подавление синтеза белка в цитозоле и ЭР, которое усиливается при 5 ч СДР. Синтез мембранных белков МХ почек при 2 ч СДР не изменяется. Снижение скорости включения радиоактивного предшественника в мембранные белки ЭР и МХ почек через 2 ч после декомпрессии и резкое усиление синтеза белка в цитозоле указывают на факт нарушения процессинга встраивания мембранных белков в МХ и ЭР. Именно этот период декомпрессии характеризуется резким выбросом в кровяное русло токсических продуктов, которые образуются в почках. Об этом свидетельствуют также описанные клинические наблюдения после землетрясений, а именно интоксикация организма после первых часов декомпрессии является причиной высокой смертности.

Безусловно, что столь резкие изменения метаболизма нельзя рассматривать без включения адаптационных защитных механизмов, заложенных в организме. Нельзя исключить также роль иммунной системы в поддержании высокого уровня синтеза белка, однако она не может поддерживать высокую активность продолжительно в связи с инактивацией в результате образования токсинов в посткомпрессионном периоде.

Поступила 08.08.99

**ՍՊԻՏԱԿՈՒՅՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԸ ԼՅԱՐԴԻ ԵՎ ԵՐԻԿԱՄԵՐԻ
ԵՆԹԱԶՁԱՅԻՆ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ՓՈՐՉԱՐԱՐԱԿԱՆ ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ
ՃԶՄԱՆ ՀԱՄԱԽՏԱՆԻՑԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Հ.Ֆ.Խաչատրյան, Ա.Գ.Գևորգյան, Ջ.Լ.Բարսեղյան, Գ.Ա.Գևորգյան

Երկարատև ճգնման համախտանիշը (ԵՃՀ) ուղեկցվում է էլեկտրոլիտների բաղադրության կտրուկ փոփոխություններով, արյան մեջ թունավոր մետաբոլիտների քախանցմամբ, ողնուղեղային հեղուկի pH-ի փոփոխմամբ, ինչպես նաև բազմաթիվ այլ փոփոխություններով և բնորոշվում է բարձր մահացությամբ: Ուսումնասիրվել է սպիտակուցների սինթեզը լյարդի եւ երիկամների ենթաբջջային կառուցվածքներում էնդոպլազմատիկ ցանցում, միտոքոնդրիումներում և ցիտոզոլում:

Փորձերի արդյունքները վկայում են, որ ԵՃՀ-ի կործանարար ազդեցությունը բջջիների սպիտակուց սինթեզող ապարատի վրա միանշանակ է: ԵՃՀ-ի (2 և 5 ժ) ազդեցությունը լյարդի բջջիների վրա դրսևորվում է ընդհանուր սպիտակուցի սինթեզի 65,8% անկմամբ: Երկամայա հետճգնման ժամանակ նկատվել է ընդհանուր սպիտակուցի անկում 2,4 անգամ, իսկ հետագա հետճգնումը (24 ժ) բերում է մոտ կրկնակի ավելացման, ապա կրկին նվազեցման 48 ժ անց: Հինգժամյա ԵՃՀ-ի

ժամանակ սպիտակուցի սինթեզը գրեթե նույն ձևով է ընթանում, միայն այն տարբերությամբ, որ 4ժ հետզմումից հետո ավելի նկատելի ակտիվացում է դիտվում:

Երկկամներում երկժամյա ԵՃՀ-ից հետո տեղի է ունենում սպիտակուցի սինթեզի ընկճում ցիտոզոլում և էնդոպլազմատիկ ցանցում, իսկ միտոքոնդրիումներում այն չի փոխվում:

SYNTHESIS OF PROTEINS IN LIVER AND KIDNEYS SUBCELLULAR STRUCTURES AT EXPERIMENTAL PROLONGED CRASH SYNDROME

H.F.Khachatryan, G.A.Kevorkian, G.L.Barseghyan,
A.G.Guevorkian

Prolonged crash syndrome (PCS) is accompanied by sharp changes in electrolytes contents, penetration of toxic metabolites into blood, pH changes in cerebrospinal fluid, and other numerous changes, which result in high lethality. The synthesis of the proteins in liver and kidneys subcellular structures at endoplasmic reticulum, mitochondria and cytosol was studied. The results of the experiments testify that the destructive effect of PCS on the apparatus for cell protein synthesis is not unanimous. The effect of PCS (for 2h and 5h) on the liver cells is expressed by 65.8% decrease of total protein synthesis. During 2h after pressure it is observed a decrease of total protein synthesis 2.4 fold., while further (24h) pressure promotes two fold increase, and again decrease in 48h after. At the effect of PCS during 5h the synthesis of the protein processes almost in the same way. There is only one difference: in 4h after pressure more noticeable activation is observed. In kidneys after two hours of PCS effect there takes place an inhibition of protein synthesis in cytosol and endoplasmic reticulum, while in mitochondria no changes are observed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Г.А., Хачатрян Г.Ф., Барсегян Д.Л., Геворкян А.Г. Мед. наука Армении НАН, в печати.
2. Adachi J., Morita S., Yasuda H. et al. Clin. Chim. Acta, 1998, 101(6). 1325.
3. Du S., Rubin A., Klepper S., Barrett C. et al. Exp. Neurol., 1999, 157(1), p. 96.
4. Guth E. Exp. Neurol., 1985, 88, p. 44.
5. Mori M., Gotoh T., Nagasaki A. et al. J. Inherit. Metab. Dis., 1998, 21, 1, p. 59.
6. Oh I. Glia, 1995, 13, p. 319.
7. Rubinstein I., Abassi Z., Coleman R. et al. J. Clin. Invest., 1998, 15, 101(6), p. 1325.
8. Shigemoto T., Rinka H., Matsuo Y. et al. Ren. Fail., 1997, 19(5), p. 711.