

Действие природного гипоталамического цитокина на регуляцию уровня металлопротеинов в крови крыс при экспериментальном синдроме длительного раздавливания

А.А. Галоян, М.А. Симонян, Н.Г. Мосторян, Дж.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, металлопротеины, активные формы кислорода, цитохром b₅₅₈

Экспериментальный синдром длительного раздавливания (СДР) сопровождается активацией метаболических процессов, протекающих под воздействием ИЛ1-β и матричной РНК- ИЛ10, активность которых начинает снижаться через две недели после компрессии, что и является одной из причин патогенеза повреждения периферической нервной системы и играет значительную роль в развитии Валериановой дегенерации [13]. Спустя 4 дня после снятия компрессии развивается NO-зависимая критическая телеангиэктазия, в результате чего активируется индуцибельная NO-синтаза, сопровождающаяся интенсивно развивающимся гиповолемическим шоком [12]. Имеющиеся клинические данные показывают, что смертельный исход больных, находившихся под раздавливанием в результате землетрясений или техногенных аварий, начинается в период декомпрессии, когда почки и поврежденная некротизированная мышечная ткань начинают продуцировать токсины пептидной природы в кровяное русло. Эти токсины, присоединив к своему N-концу аргинин в виде так называемых аргининобелков начинают поступать в мозг по периферической нервной системе, проходя через гематоэнцефалический барьер, вызывая серьезные морфологические и биохимические повреждения [7]. В экспериментах на линейных мышках, генетически нокаутированных с нейрональной NO-синтазной активностью, была зарегистрирована глубокая церебральная ишемия [11]. При СДР у крыс наблюдается активирование NO-синтазной активности мозга с подавлением белоксинтезирующей активности субклеточных систем, нарушением спектра мембранных белков эндоплазматического ретикулума, митохондрий и цитозоля на фоне активных процессов белковой деградации [8]. Оксидативный стресс и повышение уровня металлопротеинов вызывают активацию глутатион-S-трансферазы и аденозиндифосфатазы в сыворотке крови, что может отрицательно воздействовать на развитие патогенеза при СДР [9].

Выявление методов и подходов для восстановления нарушенных звеньев метаболизма при СДР является актуальной задачей современной практической и экспериментальной медицинской науки. Исследования СДР на экспериментальной модели, начатые нами в конце 70-х годов прошлого столетия, выявили новые данные по уровню повреждения ткани мозга вплоть до картины, характерной для нейродегенерации мозга [10]. В этом аспекте особая роль придается действию гипоталамического цитокина – пролином богатого полипептида (ПБП), открытого акад. А. Галояном, восстанавливающего поврежденные звенья метаболизма и, в особенности, морфологическую картину ткани мозга вплоть до интактного уровня [8]. С другой стороны, при СДР и различных ревматических заболеваниях развивается оксидативный стресс с вовлечением металлопротеинов, обусловленный повышением в сыворотке крови глутатион-S-трансферазы, аденозиндифосфатазы, перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках печени и сердца, увеличением агрегации эритроцитов [6,9,10]. При этом противовоспалительный, антигипоксический и регулирующий эффект оказывают лецитиновые липосомы, полиэтокс (полиэтилен оксид) и др.

Патогенез СДР включает в себе элементы болевого стресса, шока и др. проявлений [1], при которых наблюдается нарушение физиологического равновесия между продуцированными и утилизируемыми активными формами кислорода (АФК) металлопротеинами крови. Это создает определенный фон оксидативного стресса. Однако молекулярно-биохимические механизмы оксидативного повреждения элементов крови при СДР остаются еще нерешенными.

Целью настоящей работы является определение количественных и качественных сдвигов анти- и прооксидантной активности металлопротеинов крови при 2-часовой компрессии с последующей 4-часовой декомпрессией и воздействия природного гипоталамического цитокина ПБП.

Таблица 1

Относительные изменения (%) уровней активности МПА и МАА при раздавливании крыс по сравнению со 100% контрольными показателями

| Металлопротеины | 2 ч раздавливания, % | Через 4ч после 2 ч раздавливания, % | Через 4ч после 2 ч раздавливания + ПБП, % |
|--|----------------------|-------------------------------------|---|
| Цитохром b ₅ | нет изменения | -33,3 ± 2,6 | -6,7 ± 0,4 |
| ∑Цитохром b ₅₅₈ I, II | +100,0 ± 6,1 | +30,0 ± 2,4 | -15,0 ± 2,3 |
| ∑Цитохром b | -31,5 ± 2,7 | нет изменения | -30,0 ± 1,9 |
| Цитохром b ₅₅₈ III | -17,7 ± 1,4 | -14,2 ± 1,3 | -3,6 ± 0,1 |
| Цитохром b ₅₅₈ IV | -60,6 ± 4,1 | +49,1 ± 3,9 | +4,4 ± 0,2 |
| Нейтральный цитохром b ₅₅₈ | -18,3 ± 2,2 | -31,1 ± 2,0 | +7,1 ± 0,2 |
| Супрол | +91,1 ± 5,8 | +27,4 ± 3,2 | +31,9 ± 2,1 |
| O ² - продуцирующая активность супрола | -25,3 ± 5,1 | -38,6 ± 2,7 | -51,0 ± 5,1 |
| O ² - продуцирующий цитохром b ₅₅₈ III | -19,3 ± 2,4 | -14,4 ± 1,7 | -8,3 ± 1,1 |
| Церулоплазмин | -18,3 ± 1,3 | -9,2 ± 0,2 | -4,5 ± 0,3 |
| Трансферрин | -50,3 ± 3,4 | -30,0 ± 1,1 | +15,3 ± 1,9 |
| Cu,Zn-СОД | -8,9 ± 1,1 | -5,6 ± 0,2 | -20,0 ± 1,9 |
| Каталаза | +52,8 ± 3,6 | -88,1 ± 5,4 | -88,6 ± 4,9 |

Примечание. + возрастание, - убывание; p<0,05; n=8.

ждается увеличением уровня ЦП белка острой фазы [2]. Однако уровень ТФ снижен наполовину, что свидетельствует о заметном нарушении метаболизма железа в сыворотке крови. Уровень цит. b₅ (основной электрон-переносчик в системе метНв редуктазы) не изменяется. В приведенном режиме раздавливания

Материал и методы

СДР у белых половозрелых крыс (220–250г) вызывали путем раздавливания бедренной мышцы на специальной установке, с силой раздавливания 100 кг/кг массы животного и продолжительностью 2 ч с последующей 4-часовой декомпрессией. Кровь забирали после декапирования животных, стабилизировали 2% оксалатом натрия. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы: I – интактная, II – контрольная (2-часовая компрессия) и две опытные: III – без лечения и IV – 4-часовая декомпрессия после введения ПБП. В каждой группе было 8 животных. ПБП вводили внутримышечно за 2 часа перед декомпрессией в количестве 10 мкг на 100 г массы животного. Металлопротеины антиоксидантной активности – МАА (Cu,Zn-СОД, каталаза, церулоплазмин и трансферрин, полученные из сыворотки крови и растворимой фракции эритроцитов) и металлопротеины прооксидантной активности – МПА (цит. b₅₅₈, цит. b₅₅₈ I и II из сыворотки крови, нейтральные цит. b₅₅₈ III и IV и цит. b₅₅₈ из эритроцитарных мембран (ЭМ), супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол, а также цит. b₅, полученный из растворимой фракции эритроцитов в высокоочищенном виде [3], цит. b₅₅₈ из ЭМ, без использования детергента для солиubilизации цитохромов [4]). Белковые фракции сыворотки, растворимой части эритроцитов и ЭМ подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52, KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексе DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция).

Количество металлопротеинов определяли путем измерения плотности характерного металлопротеинового оптического поглощения, которое имеется для цит. b₅ при 525 нм, изоформ цит. b₅₅₈ – 530 нм, церулоплазмينا (ЦП) – 610 нм, трансферрина (ТФ) – 470 нм и супрола – 430 нм.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности.

Результаты и обсуждение

В результате раздавливания в течение 2 часов с дальнейшей 4-часовой декомпрессией у крыс наблюдается заметное изменение эндогенных уровней металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК (табл. 1).

При этом существенно повышается уровень сывороточных цитохромов b₅₅₈, которые защищают биосистемы крови от повреждающих эффектов H₂O₂ [5]. Одновременное повышение уровня супрола сопровож-

наблюдается снижение уровня цит. b_{558} ЭМ с небольшим увеличением его O^2 - продуцирующей активности в гомогенной фазе, что свидетельствует об определенном нарушении состава и соответственно функции ЭМ. Такое снижение уровня цит. b_{558} , возможно, связано с увеличением самоагрегации этих гемопротеинов в гетерогенной фазе в ЭМ, что в свою очередь может вызывать снижение естественной текучести ЭМ и в целом увеличение агрегированности эритроцитов и вязкости крови. Приведенные факторы могут отрицательно влиять и на гемодинамику крови. Уровень МАА – Cu, Zn -СОД и каталазы изменяется различным образом: небольшое снижение активности Cu, Zn -СОД в эритроцитах компенсируется увеличением каталазной активности (табл. 1).

Таблица 2

Относительные изменения антиоксидантного и прооксидантного** статуса в сыворотке крови и эритроцитах (%) после 2-часовой компрессии и 4-часовой декомпрессии по сравнению с интактными животными*

| Компоненты крови | Антиоксидантный статус | Прооксидантный статус |
|------------------|------------------------|-----------------------|
| Сыворотка | +50,0 ± 3,4 | +311,8 ± 14,3 |
| Эритроциты | +49,9 ± 4,7 | -31,5 ± 2,8 |

* расчетный суммарный уровень МАА (антиоксидантный статус), ** расчетный суммарный уровень МПА (прооксидантный статус), $p < 0,05$; $n = 8$

В целом молекулярно-биохимические механизмы оксидативного повреждения компонентов крови в

контрольной группе обусловлены резким изменением прооксидантного статуса (расчетный суммарный уровень МАА) в сыворотке крови и эритроцитах, хотя антиоксидантные статусы в них практически совпадают (табл. 2). В экспериментальной группе в результате 2 ч компрессии и 4 ч декомпрессии динамика изменений уровней МАА и МПА существенно отличается от таковых в контрольной. Через 2 ч компрессии и 4 ч декомпрессии на фоне снижения уровня цит. b_5 , изоформ цит. b_{558} , цит. b_{558} IV, нейтрального цит. b_{558} наблюдается повышение уровня сывороточных цит. b_{558} и цит. b_{558} III, ЭМ со снижением O^2 - продуцирующей активности. Наблюдается снижение уровня ТФ и резкое снижение уровня каталазы, хотя уровни ЦП и Cu, Zn -СОД практически не изменяются. Происходит повышение уровня супрола на фоне снижения его O^2 -продуцирующей активности. Это может быть связано со снижением липидной пероксидации фосфолипидных остатков супрола, приводя к некоторой стабилизации этого липопротеина. В группах животных с 2-часовой компрессией и 4-часовой декомпрессией и после введения ПБП наблюдается некоторое регулирование уровней отдельных МАА и МПА (в частности цит. b_5 , цит. b_{558} I, цит. b_{558} II, цит. b_{558} III и ТФ), однако уровень и активность остальных металлопротеинов еще отстают от нормы. Можно констатировать, что в приведенном режиме ПБП проявляет регуляторное воздействие, но не полностью восстанавливает нарушенный баланс между МАА и МПА.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что в механизмы индукции стресса, вызванного СДР, вовлечены цитокины и прооксидантный статус сыворотки крови.

Поступила 15.07.05

Հիպոթալամոսային ցիտոկինի ներգործությունը առնետների արյան մեղադարձությունների մակարդակի կարգավորման վրա փորձարարական երկարապարհի ճգնման համախտանիշի ժամանակ

Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Ա. Մինոնյան, Ն.Գ. Մոսպորյան, Զ.Լ. Բարսեղյան, Գ.Ա. Գևորգյան

Հետազոտվել են երկժամյա ճգնման և նրան հաջորդող չորսժամյա հետճգնման ժամանակ առնետների արյան հակա- և պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների քանակական և որակական տեղաշարժերը: Հետճգնման 4-րդ ժամում ներարկվել է պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ (ՊՀՊ):

Երկժամյա ճգնման և հաջորդող չորսժամյա հետճգնման ընթացքում առնետների մոտ դիտվում են

թթվածնի ակտիվ ձևերի նյութափոխանակության կարգավորիչների՝ մետաղապրոտեինների քանակական նկատելի փոփոխություններ, որն էլ բերում է օքսիդատիվ սթրեսի առաջացմանը: Ընդ որում, էպիտե բարձրանում է H_2O_2 -ի վնասակար ազդեցությունից արյան կենսահամակարգերը պաշտպանող շիճուկային b_{558} ցիտոքրոմների մակարդակը: Դրա հետ միաժամանակ բարձրանում են նաև սուպրոլի և

ցերուտայազմին մակարդակները, մինչդեռ ցիտոքրոմ b₅-ի քանակը չի փոխվում:

Նշված ճգնման ռեժիմում հոմոգեն ֆազում և էրիթրոցիտային թաղանթներում (ԷԹ) նկատվում է ցիտոքրոմ b₅₅₈-ի մակարդակի ցածրացում՝ O₂՝ գոյացնող ակտիվության ոչ շատ մեծացումով, կապված հետերոգեն ֆազում հեմոպրոտեինների

ինքնաագրեզացիայի ավելացման հետ, որը վկայում է ԷԹ-ի ֆունկցիայի խախտման մասին: Սա էլ իր հերթին առաջացնում է ԷԹ-ի բնական հոսունության ցածրացում, էրիթրոցիտների ագրեզացում:

Բերված գործոնները բացասաբար են ազդում արյան հեմոդինամիկայի վրա:

Effect of natural hypothalamic cytokine on regulation of metalloproteins level in rat blood at experimental prolonged crush syndrome

A.A. Galoyan, M.A. Simonyan, N.G. Mostoryan, J.L. Barsegyan, G.A. Kevorkian

The qualitative and quantitative shifts of anti- and prooxidative metalloproteins in rat blood have been studied at two hours compression and following it four hours post-compression, as well as after PRP (proline-rich polypeptide) administration.

At two hours compression and following it four hours post-compression period there are observed essential changes in internal level of metalloproteins the regulators of metabolism reactive oxygen species (ROS), which induce oxidative stress. Hence, a significant increase takes place at the level of serum cyt.b₅₅₈, which protects the blood biological systems from harmful impact of H₂O₂. Simultaneously, the levels of suprol and ceruloplas-

min increase. Cyt.b₅ level remains unchanged.

Under the indicated compression and post-compression conditions in the homogenous phase there is observed in the erythrocyte membranes (EM) a decrease of cytochrome b₅₅₈ level with a slight increase in its O₂ producing activity, which indicates to the EM function disturbance and relates with increase of self-aggregation of hemoproteins at heterogeneous phase. In its turn it induces decrease of EM natural flow, aggregation of erythrocytes.

The obtained data make a negative effect on the blood hemodynamics.

Литература

1. Манукян А.А., Симонян М. А., Симонян Р.М., Симонян Г. М. Эксп. клин. фармакол., 2004, т. 1, с. 28-31.
2. Мжелская Т. И. Бюлл. эксп. биол. мед., 2000, т. 130 (8), с. 124-132.
3. Симонян М. А., Симонян Г. М. Лиц. изобрет. N311 Армпатента, Ереван, 1997.
4. Симонян М. А., Симонян Г. М., Симонян Р. М. Лиц. изобрет. N908 Армпатента, Ереван, 2001.
5. Симонян М. А., Симонян Г. М., Симонян Р. М. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины", 1999, Ереван, с. 48-51.
6. Elskii V. N., Stefanov A.V., Mareeva T.E. Ukr.Biokhim. Zh., 1993, 65(5), p. 109-112.
7. Galoyan A.A., Gevorkian G.A., Voskanyan L.H., Alexanyan S.S., Muradyan M. Sh. Neurochem. Res., 1988, 13, p. 493-498.
8. Gevorkian G.A., Kanayan A.S., Hayrapetyan H.L., Guevorkian A.G., Marukhyan G.L., Avagesyan S.A., Manukyan L.O., Voskanyan L.H., Galoyan A.A. Neurokimiya (Neurochemistry, Joint Journal of Russian Acad. of Sci. and Armenian Natl. Acad. of Sci., in Russian). 2002, 19, p. 297-303.
9. Kumagai S. Rinsho Byori., 1998, 46(6), p. 574-580.
10. Plotnikov M.B., Chernyshova G.A., Smoliakova V.T., Aliev J.T., Sutormina T.G. Eksp. Klin. Farmakol., 2004, 67(3), p. 21-25.
11. Rubinstein I., Abassi Z., Coleman R., Milman F., Winauer J., Better O.S. J. Clin. Invest., 1998, 101, p. 1325-1333.
12. Westphalen R.A., Dood P.R. J. Neurochem., 1998, 71, suppl. 49., p. 231.
13. Yoles E., Hauben E., Palgi O. et al. J. Neurosci. 2001, 21, 1a, p. 142.