

Некоторые биохимические особенности повреждения почечной ткани при синдроме длительного раздавливания

**А.А.Мкртчян, Р.Л.Айрапетян, Г.Ф.Хачатрян,
А.Г.Геворкян, Г.А.Геворкян**

*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: синдром длительного раздавливания (СДР), почки, синтез белка, пептиды, токсины, компрессия, декомпрессия

Быстрое расстройство скелетных мышц при длительном раздавливании в результате воздействия физических, химических или биологических факторов, названное рабдомиолизисом, приводит к выпуску в кровоток продуктов деструкции мышечных клеток. Некоторые из них, такие как миоглобин и фрагменты его протеолиза, могут привести к острому почечному отказу, который можно предотвратить внутривенными вливаниями большого количества жидкостей, гемофильтрацией или диализом. Рабдомиолизис и его осложнения являются главными проблемами при оказании помощи раненым при землетрясениях или техногенных катастрофах. Первые объяснения подобных проявлений были даны в 1941 году известным английским врачом Биватерсом [2,3]. Признанными физическими причинами для развития рабдомиолизиса являются длительное неподвижное состояние тела во время хирургических вмешательств, зажим артерий, артериальный тромбоз, уменьшение кровотока, удар молнии или электрошок и т.д.

Рабдомиолизис сопровождается повышением в крови уровня креатина, мочевины, креатинина и гиперкалиемией. Низкий уровень кальция в начальной стадии развития патологии происходит из-за связывания кальция с поврежденными мышечными клетками. Повышение уровня трансаминаз на 25% осложняет интерпретацию причины столь высокой активности – это травмирующее или нетравмирующее повреждение печени либо рабдомиолизис. Самым надежным тестом при рабдомиолизисе служит повышенная активность креатинкиназы в крови до 5 раз. Из-за быстрого периода полураспада миоглобина, этот метод не может служить тестированием рабдомиолизиса на поздних стадиях. Все эти показатели вместе взятые указывают на необходимость

проведения фасциотомии – разреза мышцы для снижения давления в самой мышце, а после обработки раны асептическими растворами – вымывания токсических продуктов распада миоглобина.

Ранее нами было показано, что основной причиной развития некротического повреждения миокарда являются продукты протеолитического расщепления миоглобина и высвобождение в кровяное русло 4 токсических пептидов, впоследствии обнаруженных в миокарде [4]. Было также обнаружено, что в результате проникновения миоглобина в почки и их протеолиза почки становятся поставщиками токсинов пептидной природы во все орган-системы организма, подвергшегося раздавливанию.

Целью настоящего исследования является выяснения нарушения некоторых сторон метаболизма в почечной ткани при СДР.

Материал и методы

Краш-синдром вызывали раздавливанием мягких тканей бедра на специальном прессе с силой 100 кг на 1 кг массы животного в течение 2 и 5 часов. Эксперименты проводили на следующих группах животных: интактная, контрольные группы – 2 и 5 часов раздавливания и опытные группы – 2, 4, 24 и 48 часов после раздавливания.

Уровень синтеза мембранных белков митохондрий (Мх), эндоплазматического ретикулума (ЭР) и цитоплазмы изучали *in vivo* путем введения ^{14}C -лейцина.

Все эксперименты проводились на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г. После декапитации под легким наркозом у животных извлекали почки, перфузировали 0,15 М раствором КСl, раздавливали в специальном прессе с микроотверстиями, гомогенизировали в 0,44 М растворе сахарозы с 1мМ ЭДТА при pH 7,4 и подвергали дифференциальному центрифугированию с целью получения субклеточных фракций – цитозоля, митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Чистоту полученных фракций определяли морфологически и энзиматически по цитохромоксидазе для внутренних мембран и моноаминоксидазе для внешних мембран Мх и Са-АТФ-азы для определения чистоты фракции ЭР. Уровень радиоактивности ^{14}C в пробах измеряли на сцинтилляционном спектрометре SL-4221.

Токсические пептиды из ишемизированной мышцы разделяли электрофоретически на 10% ПААГ, используя метод фракционирования пептидов. Окраску производили красителем "Rainbow" (Amersham Radiochemical Comp., England), окрашивающим пептиды в разные цвета по их молекулярному весу.

Распределение меченых токсических пептидов, выделенных из ишемизированных почек, изучали после их очистки и введения *in vivo* интактным крысам с последующей автордиографией.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что в процессе 2-часовой компрессии скорость синтеза белков растворимой фракции клеток почек подавляется на 37,8%. Через 2 часа после компрессии скорость синтеза активизируется на 40,5% по сравнению с контролем (2-часовая компрессия) и на 24,2% по сравнению с интактной группой животных. Через 4 часа декомпрессии скорость синтеза белка максимально повышается, достигая 54,4% и 37,9% соответственно у контрольных и интактных животных. После столь значительной активации белоксинтезирующего аппарата после 4 часов декомпрессии начинается снижение активности синтеза белка, через 24 часа декомпрессии, однако, продолжает оставаться высокой по сравнению как с контрольной группой (на 67,6%), так и с интактной (на 29,1%). И, наконец, через 48 ч декомпрессии уровень синтеза белка в цитозоле почек снижается и доходит до интактного уровня.

В те же изученные сроки развития патологии белки эндоплазматического ретикулаума подвергаются следующим изменениям: компрессия в течение 2 ч приводит к снижению скорости синтеза белка на 32,4% и продолжается после 2 ч декомпрессии, доходя до 58,7%, и, начиная с 4 ч декомпрессии, повышается до интактного уровня к 48 часам декомпрессии.

Таблица 1

Скорость синтеза белка в ультраструктурных компонентах почек после 2 часов компрессии и 2, 4, 24 и 48 ч декомпрессии

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

Примечание. Здесь и в табл. 2 P_1 – достоверность между интактной и контрольной группами животных, P_2 – достоверность между контрольной и опытными группами. Данные выражены в распадах·мин·мг⁻¹ белка, n=6

Белоксинтезирующая активность митохондриальной фракции в период компрессии не подвергается изменениям, резко подавляется в период 2- и 4-часовой декомпрессии (соответственно на 47 и 32,7%) и приравнивается к интактному уровню через 24 и 48 ч декомпрессии (табл. 1).

Исследования белоксинтезирующей активности были проведены также после 5 часов компрессии.

Так, если 2-часовая компрессия приводит к резкому подавлению скорости синтеза белка в растворимой фракции клеток почек (на 37,8%), то 5-часовая компрессия сопровождается активацией процесса синтеза белка на 37,8%. Таким образом, изученные нами два периода компрессии – в течение 2 и 5 ч выявляют диаметрально противоположный эффект белоксинтезирующей активности цитозоля с одинаковой интенсивностью – 37,8%. Через 2 ч декомпрессии активность падает на 40%, что ниже даже интактного уровня, вдвое активизируется через 4 часа декомпрессии и остается выше интактного уровня через 24 и 48 ч декомпрессии.

В отношении синтеза белка во фракции эндоплазматического ретикулула зарегистрированы следующие сдвиги. После 5 часов компрессии особых сдвигов не наблюдается. Однако уже через 2 ч декомпрессии эта величина подавляется более чем в 2 раза, столь же резко (в 3,3 раза) повышается через 4 ч декомпрессии, остается выше интактного уровня спустя 24 часа после компрессии и снижается к 48 ч декомпрессии, оставаясь вдвое активнее периода 2 ч декомпрессии.

Идентично с картиной изменения скорости синтеза белка фракции эндоплазматического ретикулула меняется синтез белка во фракции митохондрий почек. 5-часовая компрессия не меняет картины синтеза белка по сравнению с интактной группой животных, резко (в 2,9 раза) подавляется через 2 ч декомпрессии, столь же резко активизируется через 4 часа декомпрессии – в 3,7 раза, статистически недостоверно меняется через 24 часа декомпрессии и, как в случае белков ЭР, снижается через 48 ч декомпрессии ниже интактного уровня (табл. 2).

Из изложенных результатов становится очевидным, что наиболее активная протеолитическая активность проявляется во фракции ЭР и Мх, особенно выраженная в первые часы декомпрессии. Фрагменты протеолитического распада белков ЭР и Мх обуславливают высокую радиоактивность, а следовательно, и белок в растворимой фракции клеток почек.

Следует отметить, что анализ фрагментов протеолиза в растворимой фракции клеток почек выявляет 4 пептидных остатка, не характерных белковому спектру почечной ткани. Они сравнимы с пептидами из раздавленных мышц мягких тканей, впоследствии обнаруженных и в миокарде, им приписывали роль *миокард-*

Таблица 2

Скорость синтеза белка в ультраструктурных компонентах почек после 5 часов компрессии и 2, 4, 24 и 48 ч декомпрессии

Фракция	Интактная группа	Контроль (компрессия)	Экспериментальная 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 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$

депрессирующих факторов [1]. Эти же пептиды определены в мозгу, однако, как они проникают в мозг не удалось доказать, поскольку было показано, что они не проникают через гемато-энцефалический барьер.

Природу этих пептидов удалось показать после анализа и сопоставления аминокислотной последовательности молекулы миоглобина и идентифицированных 4 пептидов, как фрагментов миоглобина. Наличием этих пептидов в крови, с последующей транслокацией в различных органах, можно определить токсикоз при развитии СДР.

Токсины почечного генеза были обнаружены в мозговой ткани несмотря на то, что нами была показана задержка этих пептидов в гемато-энцефалическом барьере. В дальнейшем с помощью наших американских коллег удалось показать, что эти пептиды проникают в мозг и вызывают его повреждение наподобие нейродегенеративного поражения, карабкаясь по нервным волокнам, обходя гемато-энцефалический барьер.

Поступила 02.06.10

Երիկամային հյուսվածքի վնասման որոշ կենսաքիմիական առանձնահատկությունները երկարատև ճգնման համախտանիշի ժամանակ

Ա.Ա.Մկրտչյան, Հ.Լ. Հայրապետյան, Հ.Ֆ.Խաչատրյան,
Ա.Գ.Գևորգյան, Գ.Ա.Գևորգյան

Դիտարկվում է երիկամների վնասման խնդիրը երկարատև ճգնման համախտանիշի ժամանակ: Յույց է տրվում, որ ճգնման հետևանքով

վնասված երիկամներում տեղի է ունենում միոգլոբինի ինտենսիվ պրոտեոլիզ, որի արդյունքում անջատված 4 թունավոր պեպտիդները թափանցում են երիկամներ, այնուհետև մաև ուղեղ և առաջացնում են վնասվածքներ այդ օրգաններում: Երիկամներում ընթանում է սպիտակուցային մոլեկուլների դեգրադացիոն գործընթացների ակտիվացում, որը գերակշռում է սինթեզի նկատմամբ և որի հետևանքով քայքայվում են ենթաբջջային օրգանիզմների թաղանթները:

Some biochemical peculiarities of kidney tissue damage at crush syndrome

A.A.Mkrtchyan, H.L.Hayrapetyan, H.F.Khachatryan, A.G. Guevorkian, G.A.Kevorkian

The problem of kidneys damage at crush syndrome is discussed. It is shown that in result of a muscle damage at its crush an intense proteolysis of the myoglobulin takes place, the fragments of which in a number of 4 peptides penetrate to kidneys, then to brain as well, inducing damage to these organs. In kidneys an activation of processes for protein molecules degradation takes place prevailing over the synthesis and resulting in breakdown of membranes of subcellular organelles.

Литература

1. *Мелконян Л.Г.* Некоторые биохимические особенности повреждения миокарда при экспериментальном синдроме длительного раздавливания. Дис. ...канд. биол. наук, Ереван, 2009.
2. *Bywaters E.G, Beall D.* Crush injuries with impairment of renal function. Br. Med. J., 1941, 1: 427-32.
3. *Bywaters E.G.L.* "Ischaemic muscle necrosis". J. Am. Med. Assoc., 1944, 124: 1103-9.
4. *Kevorkian G, Kanayan A., Hayrapetyan H., Guevorkian A., Melkonyan L., Galoyan A.* Necrotic injury of a myocardium at the experimental crush syndrome and an opportunity of its treatment. FEBS, 2006, v. 273, p.663.