

ԱԵՒ ԾԵՒ ԵՅ

УДК 577.152.1+171.3+616.61

Ա. Ն. Աթաթյանի, Ի . Ա. Ասատյանի, Վ. Ս. Արսենյանի, Ի . Ա. Նունյանի

Ի ածանցի ու մեթոդաբանական հետազոտություններում
 համախառնումները համարվում են համապատասխան
 ինքնազգայնացման և ստրեսսի պայմաններում
 ինքնազգայնացման և ստրեսսի պայմաններում

(Представлено 30/X 2006)

Եթ-հանդիսանք: *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 капша-В, селективные ингибиторы которого (пиролидин дитиокарбамат и сульфосалазин) оказывают защитный эффект [1]. Однако молекулярно-биохимические механизмы воздействия гентамицина на свойства металлопротеинов 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 (МАО) (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 МАО 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 МАО 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 внутривентриально (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). МАО 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 МАО 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 формаза (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. МетНб-восстанавливающую активность цит b558 (в гомогенной и гетерогенной фазах) определяли кинетическим методом [6], путем регистрирования снижения плотности альфа-полосы поглощения ферриНб при 565 нм (это снижение прямо пропорционально увеличению плотности поглощения образовавшегося ферроНб 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 метНб-восстанавливающая активность этого гемопротейна. При этом под воздействием гентамицина величина оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{530}) цит b558III увеличивается на 21-24%. Таким образом, механизм потери метНб-восстанавливающей активности цит b558 гентамицином связывается с изменением его плотности поглощения Core (при 412 нм) с соответственным изменением нативности хромофорной группы этого гемопротейна ЭМ. Незащищенность новых изоформ цит b558 МК органов иммунной системы от гентамицина более выражена. В приведенных условиях гентамицин резко (до 301.8%) снижает плотность оптического поглощения фракции цит b558 МКС и вызывает необратимую агрегацию этого гемопротейна с потерей его НАДРН-зависимой супероксидпродуцирующей и метНб-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.

Όαάέεöà 1

Î öí îñèöàéüí îá èçì áíáí èà (%) öðíáí ü è àèöèáí îñòè Ì ÀÀ è Ì Ì À èðíáè è Ì Ê ñáèáçáí èè, öèì öñà è èíñòí îñî ì íçãà ì îá áîçãáéñöàèáì ááí öàì èöèí à ìñèà èö èí èöáèðí ááí èü â öá÷áí èà 48 ÷ (in vitro) è 5 ñòòêè (ex vivo) ì î ñðááí áí èð ñ 100% èí î öðí èüí ùì è ì èàçàöàéüí è â îñòòñòèöàèà ááí öàì èöèí à, $P < 0.05$, $n = 8$

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
МетНв-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе	-89.8±4.3	-51.3±4.8
МетНв-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
Сu,Zn-СОД	+10.2±0.2	+17.3±2.4
Каталаза	-14.3±1.6	-26.1±2.4

Примечание. Гентамицин подавляет метНв-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 метНв-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 $31.3 \pm 5.4\%$, а после в/б введения БПП-1 - $9.6 \pm 1.1\%$). Механизм положительного эффекта БПП-1 при нефротоксикозе в основном связан с тем, что в приведенных количествах этот полипептид стимулирует метНв-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.

Î òíîñèòàèüí îá èçì áíáíèà òðíáíÿ è àèòèáíîñèè Ì Ì Æ è Ì ÆÆ èðíàè è Ì Ê ñàèçáíèè, òèì òñà è èíñòííâ ì îççà ì ðè íàòðíòíèñèèçà è ðóñ ì îá âîçäàèñòàè àí òòðèáðøèíí ãããããííâ ããí òàì èòèà è à îñòóòòàèà è îá âîçäàèñòàè àí òòðèáðøèíí ãããããííâ

ÃÏ Ì -1 ì ñäáíáíèð ñî 100 % èí îðíèèí ùè è îíèçàòàèÿ è ($P < 0.05, n = 8$)

МП, активность	Гентамицин	Гентамицин+БПП-1
1	2	3
Цит b5	-19.2±2.1	-14.8±3.3
∑ 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 MKC в гомогенной фазе	-27.6±3.3	-19.2±1.3
O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKC в гетерогенной фазе	-37.8±2.5	-11.7±0.7
O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKKM в гомогенной фазе	-21.5±1.8	-16.7±3.0
O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKKM в гетерогенной фазе	-12.8±1.6	- 10.4±0.2
O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKT в гомогенной фазе	-16.7±2.7	- 14.8±1.5
O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKT в гетерогенной фазе	-26.8±4.0	- 21.9±3.4
МетHb-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе	-48.5±3.1	-12.8±1.4
МетHb-восстанавливающая активность цит b558III в гетерогенной фазе	-31.5±2.2	- 21.3±2.1
МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKC в гомогенной фазе	-81.3±3.9	- 56.8±5.0
МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKC в гетерогенной фазе	-63.2±4.4	- 23.8±5.1

1	2	3
МетHb-восстанавливающая активность цит b558 МККМ в гомогенной фазе	-39.7±5.0	- 21.7±3.6
МетHb-восстанавливающая активность цит b558 МККМ в гетерогенной фазе	-25.8±3.2	- 19.5±4.1
МетHb-восстанавливающая активность цит b558 МКТ в гомогенной фазе	-23.8±2.2	- 17.5±2.6
МетHb-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. Бунятына

А. Н. Асааева, И . А. Асааева, А. А. Асааева, И . А. Нейтрон

Исследование влияния гентамицина на активность цитохрома b558 и антиоксидантных металлопротеинов in vitro, ex vivo и in vivo при нефротоксикозе крыс. Внутривенно введенный богатый пролином полипептид оказывает антистрессорный эффект.

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. Внутривенно 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

Գենդամիցինի տոքսիկ ազդեցության մեխանիզմները, և պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի դրական դերը առնետների՝ գենդամիցինով հարուցված նեֆրոտոքսիկոզի ժամանակ

Գենդամիցինը հակաբիոտիկ է և կոչված է չեզոքացնելու անփոփոխները: Այնուհանդերձ գենդամիցինը բացասականորեն է ազդում օրգանիզմի պաշտպանիչ համակարգի բաղադրամասերի՝ փայծախի, թիմուսի և ոսկրածուծի բջջաթաղանթներից անջատված ցիտոքրոմ b558-երի նոր իզոմերների, ինչպես նաև որոշ հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մերադապտոբեյնների վրա՝ *in vitro*, *ex vivo* և *in vivo* առնետների՝ գենդամիցինով հարուցված նեֆրոտոքսիկոզի ժամանակ: Ընդ որում պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդը կարարում է հակաաթրեսային դեր:

Սրացված արդյունքները հիմք են տալիս վերագնահատելու գենդամիցինի՝ 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. Intraperitoneally 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.

Էնթոթաթոթա

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.