

БИОХИМИЯ

УДК 577.1 616-001.28/.29

К. И. Израелян¹, П. А. Казарян^{1,3}, Р. Х. Саакян², М. А. Симонян⁴

Отдаленные последствия радиационного поражения миокарда и регуляторные механизмы в мембранах кардиомиоцитов

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 23/VI 2011)

Ключевые слова: *ионизирующее облучение, кардиомиоциты, фосфоинозитиды, фосфатидная кислота, фосфолипаза A₂, ПОЛ, простагландин-Н-синтетаза, СОД, каталаза*

Повреждающее действие ионизирующего облучения приводит к нарушению различных звеньев метаболизма и функциональной активности клеток [1, 2]. При этом в роли регуляторных обезвреживающих систем, предупреждающих более глубокие повреждения клеток свободными радикалами, выступают эндогенные защитные механизмы. Первую линию защиты осуществляют фосфолипиды биомембран, а также антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза). Несомненно, увеличение активности фосфолипаз при ионизирующем облучении и усиление процессов перекисления липидов (ПОЛ) способствуют деструкции биологических мембран. Эти нарушения вызывают изменения электролитного обмена, повышение осмолярности цитоплазмы вследствие накопления Na^+ и Ca^{2+} в клетке, потерю способности митохондрий аккумулировать внутриклеточный кальций, что приводит в итоге к нарушению баланса ионов кальция, сказывающемуся на нормальном функционировании миокарда [3, 4].

Сегодня не вызывает сомнения участие свободнорадикальных процессов в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений сердца [1]. По литературным данным развитие ишемической контрактуры происходит вследствие потери регуляции содержания внутриклеточного кальция. Вместе с тем на фоне окислительного стресса регуляторными системами обеспечивается усиление защитных адаптационных механизмов [2, 5]. Известно, что факторы внутриклеточной адаптации экспрессируются также посредством активации фосфолипаз (А, С), повышения уровня фосфоинозитидов (ФИ), которые являются мощными регуляторами внутриклеточных процессов. Трансдукция сигналов в фосфоинозитидной системе посредством вторичных мессенджеров (трифосфоинозитиды, фосфатидная кислота (ФК) и диацилглицерол) сопровождается увеличением концентраций ионов кальция в клетке и активацией Са-зависимых протеинкиназ, MAP-киназного каскада [6 - 8]. В свою очередь ФК, обладающая функцией кальциевого ионофора, инициирует транспорт ионов Ca^{2+} по градиенту концентрации в цитоплазму, тем самым активируя Са-регулируемые процессы в клетке [9]. Однако в большинстве случаев в кардиомиоцитах вследствие гиперкальцификации возможны необратимые повреждения [1, 10].

Таким образом, кальциевые механизмы повреждения клеток миокарда рассматриваются в соответствии с активацией фосфолипаз, увеличением активности ПОЛ, нарушением работы митохондрий и саркоплазматического ретикулума.

Детальное изучение механизмов действия повреждающих факторов на организм и выявление биологических последствий этих воздействий в клетках и тканях позволяет определить метаболически важные показатели регуляторных систем, а также оценить их чувствительность и способность нормализовать физико-химические параметры биологических систем

Целью настоящего исследования стало изучение защитных, адаптационных антиоксидантных систем в кардиомиоцитах как ранних, так и отдаленных последствий ионизирующего облучения сублетальной дозой 3 Гр, с учетом степени гидролиза фосфолипидов клеточной мембраны и процессов их пероксидации.

Материал и методы исследований. Исследования проводились на 80 белых крысах-самцах линии Вистар массой 160-180 г, разделенных на опытные группы. Первая, контрольная, группа состояла из 10 интактных животных. Облучение животных проводили на аппарате РУМ-17 в дозе 3 Гр. Затем проводили выделение ФИ, ФК [10]. Методом тонко-

слоистой хроматографии осуществляли фракционирование ФИ на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мкм в системе хлороформ:метанол:аммиак (45:35:10) [11]. Активность ПОЛ в ткани миокарда определяли по реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [12], активность фосфолипазы A_2 – в супернатанте ткани миокарда спектрофотометрическим методом в модификации П.А. Казаряна [11, 13], скорость простагландин-Н-синтазной реакции – спектрофотометрическим методом в реакционной смеси, содержащей фосфатный буфер с добавлением раствора гемина, серингалдазина [14]. Реакцию инициировали арахидоновой кислотой. Супероксиддисмутазную активность определяли методом нитротетразолиевого синего [15], рассчитав проценты ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами в присутствии СОД. Каталазную активность устанавливали перманганатометрическим методом, рассчитав количество расщепленной H_2O_2 (М) определенным количеством фермента за 1 мин при 20°. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см [16].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия достоверности и различий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показывают, что ионизирующее облучение сублетальной дозой 3 Гр сопровождается значительными изменениями в содержании ФИ и ФК плазматических мембран миокарда (таблица).

Так, уже на 3-и сутки обнаруживается статистически достоверное повышение относительного содержания ФИ, рост которого отмечается и в последующие дни (5-й, 10-й, 45 -й и 90-й). Биосинтез ФИ в плазматической мембране и микросомах осуществляется в результате ресинтеза в фосфоинозитидном цикле, активация которого приводит к кальцификации цитоплазмы [5,17]. Также на фоне статистически достоверного повышения уровня ФК, которое наблюдается начиная с 5-го дня после воздействия ионизирующего облучения, индуцируется транспорт ионов Ca^{2+} в цитоплазму. Накопление ФИ (почти в 2.5 раза) и ФК (превышающее норму почти в 4 раза) обусловлено изменением активности фосфатидогенеза, нарушением деятельности ферментов гидролиза фосфолипидов мембран и имеет место при активации Ca -регулируемых процессов и трансдукции сигналов посредством фосфоинозитидной системы.

Относительное содержание фосфоинозитидов и фосфатидной кислоты мембран кардиомиоцитов в динамике после ионизирующего облучения дозой 3 Гр (в %)

	Контроль , n=10	3 день, n=15	5 день, n=15	10 день, n=15	45 день, n=15	90 день, n=10
ФИ	5.33±0.47	6.26±0.7 (p<0.05)	6.35±0.40 (p<0.05)	12.84±0.37 (p<0.001)	13.28±0.22 (p<0.001)	13.09±0.44 (p<0.001)
ФК	2.74±0.54	2.02±0.84 (p>0.5)	6.50±1.41 (p<0.001)	9.87±0.84 (p<0.001)	8.30±0.30 (p<0.001)	10.93±0.12 (p<0.001)

Исходя из того, что одним из повреждающих последствий воздействия ионизирующего облучения является свободнорадикальное окисление липидов, нами были исследованы процессы ПОЛ в плазматических мембранах кардиомиоцитов и состояние стресс-лимитирующих защитных систем. Так, в различные сроки после воздействия ионизирующего облучения (рис. 1) наблюдается накопление липидных перекисей (на 10-й день в 1.7 раза).

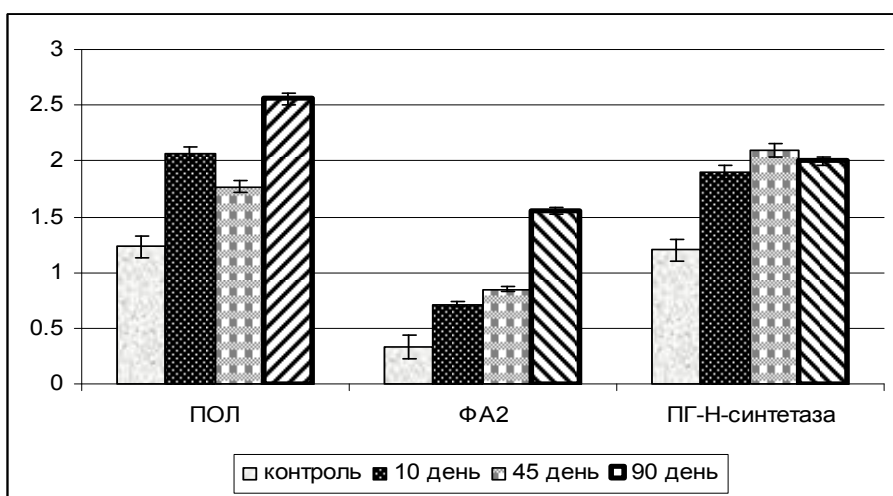


Рис.1. Уровень активности ПОЛ, фосфолипазы А₂ и простагландин-Н-синтетазы.

Максимальный уровень продуктов ПОЛ (МДА) достигается на 90-й день исследования. При этом одновременно происходит активация мембраносвязанного фермента –

фосфолипазы A_2 . Уровень активности фосфолипазы A_2 в динамике постоянно возрастает (рис.1) и достигает максимального значения на 90 день (в 2.5 раза) после ионизирующего облучения. Важно отметить, что значительное повышение этого фермента находится в корреляционной взаимосвязи с активностью простагландин-Н-синтетазы и процессов ПОЛ.

Очевидно, что фосфолипиды мембран кардиомиоцитов, в частности ФИ, под действием фосфолипазы A_2 подвергаются гидролизу с образованием арахидоновой кислоты [18], которая служит субстратом для синтеза ряда изомераз простагландинов. Полученные нами данные свидетельствуют об одновременной активации (в 1.5 раза) простагландин-Н-синтетазы (рис.1), что служит предпосылкой к индукции регуляторных стресс-лимитирующих систем. При этом простагландины могут активировать аденилатциклазу, увеличивать проницаемость мембран для ионов Ca^{2+} . В этих условиях усиливаются кальциевые нагрузки кардиомиоцитов, которые могут привести к необратимым повреждениям клеток миокарда [1, 3, 5].

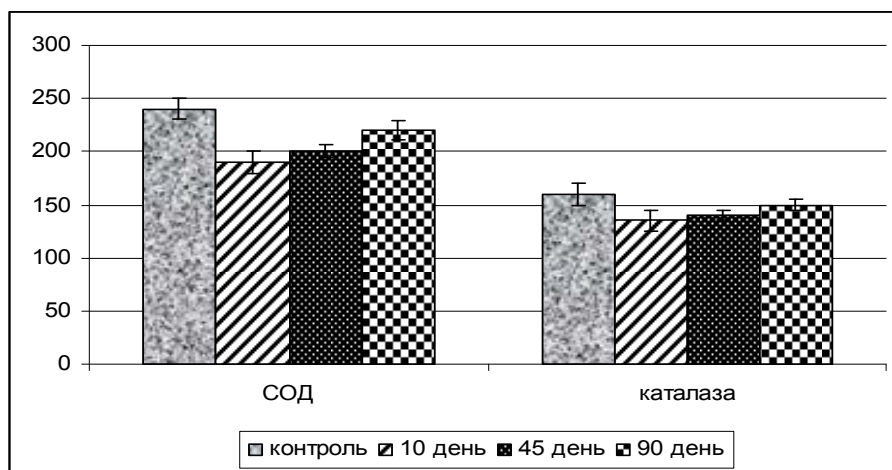


Рис.2. Уровень активности супероксиддисмутазы и каталазы кардиомиоцитов в динамике после ионизирующего облучения.

Против развития глубоких повреждающих эффектов в клетке задействованы эндогенные механизмы резистентности, к которым относится система простагландинов и антиоксидантов [2, 6, 17]. Так, наблюдаемая нами активность ферментного звена антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы) претерпевает фазные изменения (рис.2).

На ранней стадии (10-й день) после воздействия ионизирующего облучения наблюдается подавление активности СОД и каталазы. Одновременное понижение активности исследуемых ферментов не является случайным. Известно, что СОД и каталаза действуют в корреляционной взаимосвязи, обеспечивая переключение потоков электронов с одной цепи транспорта на другие [4]. В динамике после ионизирующего облучения наблюдается стабильная недостаточность антиоксидантной системы миокарда. На поздних стадиях патологии отмечается тенденция активации ферментов СОД и каталазы.

Таким образом, наблюдаемая устойчивость кардиомиоцитов к избытку ионов кальция при отсутствии признаков необратимых повреждений и обеспечение миокарда относительно стабильной сбалансированной миорелаксацией устанавливается стресс-лимитирующими системами (ПОЛ, простагландины, антиоксиданты). Последние влияют на обмен цитозольного кальция, возможно, понижая его уровень путем регуляции активности Са-АТФаз эндоплазматического ретикулума, или положительной обратной связью воздействуют на синтез простагландинов. На фоне структурно-метаболических изменений мембран кардиомиоцитов в поздние сроки после воздействия ионизирующего облучения наблюдается более согласованное действие стресс-лимитирующих и Са-зависимых систем.

¹Гематологический центр им. Р. О. Еоляна МЗ РА

²Ереванский государственный медицинский университет им М. Гераци

³Ереванский государственный университет

⁴Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

К. И. Израелян, П. А. Казарян, Р. Х. Саакян, М. А. Симонян

Отдаленные последствия радиационного поражения миокарда и регуляторные механизмы в мембранах кардиомиоцитов

Исследованы как ранние, так и отдаленные последствия ионизирующего облучения сублетальной дозой 3 Гр. На фоне активизации процессов гидролиза фосфолипидов клеточной мембраны и их перекисидации в миокарде наблюдается избыток кальция. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи антиоксидантных, фосфоинозитидных и простагландиновых регуляторных систем.

Կ. Ի. Իսրայելյան, Պ. Ա. Ղազարյան, Ռ. Խ. Սահակյան, Մ. Ա. Սիմոնյան

Իոնիզացնող ճառագայթման հեռավոր հետևանքները և կարգավորիչ մեխանիզմները կարդիոմիոցիտներում

Ուսումնասիրվել են 3 Գր սուբլետալ դոզայով իոնիզացնող ճառագայթման վաղ և հեռավոր հետևանքները կարդիոմիոցիտներում: Բջջաթաղանթի ֆոսֆոլիպիդների հիդրոլիզի և նրանց գերօքսիդացման պրոցեսների ակտիվացման ֆոնի վրա միոկարդում նկատվում է կալցիումային ծանրաբեռնվածություն: Ստացված տվյալները վկայում են հակաօքսիդանտային, ֆոսֆոինոզիտիդային և պրոստագլանդինային կարգավորիչ համակարգերի փոխկապակցված գործունեության մասին:

K. I. Israelyan, P. A. Ghazaryan, R. Kh. Sahakyan, M. A. Simonyan

Long-Term Effects of Ionizing Radiation and Regulatory Mechanisms in Cardiomyocytes

The aim of the study is the research of early and delayed effects of ionizing radiation on a sublethal dose of 3 Grey in cardiomyocytes. On the background of the hydrolysis of cell membrane phospholipids and activation of their peroxidation increased calcium load in the myocardium. The obtained data suggest a correlation relationship of antioxidant, phosphoinositide and prostaglandin regulatory systems.

Литература

1. *Порядин Г.В.* В кн.: Стресс и патология. М. Изд-во РГМУ. 2009. с.23.
2. *Нигматуллина Р.Р.* В кн.: Клеточно-молекулярные механизмы функционирования и регуляции сердца. Казань. Изд-во КГМУ. 2004. с.100.
3. *Александрова Е.А.* - Успехи физиологических наук. 2001. № 3. С. 40-48.
4. *Резник А.В., Федоров В.В, Розентираух Л.В.* - Кардиология. 2006. № 2. С. 4-18.
5. *Широкова А. В.* – Цитология. 2007. Т. 49. № 5. С.385-394.
6. *Hausenloy D.J., Murphy L.O., Blenis J.* - Trends Biochem. Sci. 2006. V. 31(5). P. 268–275.

7. *Zatta A.J., Kin H., Lee G. et al.* - Cardiovasc. Res. 2006. V. 70(2). P.315–324.
8. *Yellon D.M.* - Cardiovasc. Res. 2006. V. 70(2). P. 240–253.
9. *Рубцов А. М.* - Успехи биол. химии. 2005. Т. 45. С. 235-268.
10. *Jaconi M., Bony C., Richards S., Terzic A., Vassort G., Puceat M.* – Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. P.1845-1858.
11. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы. Распределительная и адсорбционная хроматография. М. Изд-во ЦОЛИУВ. 1982. 40 с.
12. *Stocks J., Dormandy T.L.* - Brit. J. Haemat. 1971. V. 20. P. 95-111.
13. *Grassl M., Maellering H.* - Anal. Chem. 1969. V. 243. P. 416-423
14. *Мебх А.Т., Басевич В.В., Варфоломеев С.Д.* – Биохимия. 1982. Т. 47. С.1635.
15. *Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K.* - Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1972. V. 46. № 2. P. 849–857.
16. *Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* - Лаб. дело. 1988. № 1. С.16–19.
17. *Cantley L.C.* – Science. 2002. V. 296(5573). P. 1655–1657.
18. *Damron D.S., Bond M.* – Circ. Res. 1993. V. 72. P. 376-386.