

ВЛИЯНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ НА СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В ПОЧКАХ КРЫС В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Гульнар Анузовна Байбурина*, Елена Александровна Нургалева,
Эдуард Феликсович Аглетдинов, Айгуль Фидратовна Самигуллина

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Поступила 06.10.2017; принята в печать 23.10.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-949

Цель. Исследование соотношения между показателями свободнорадикального окисления белков и липидов в почках крыс в постреанимационном периоде после остановки системного кровообращения в зависимости от их устойчивости к гипоксии.

Методы. Остановку системного кровообращения интраторакальным пережатием сосудисто-нервного пучка длительностью 5 мин моделировали под эфирным наркозом на самцах неинбредных белых крыс, разделённых после тестирования на две группы по устойчивости к гипоксии. Период наблюдения составлял 35 дней. В гомогенатах тканей почек определяли содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, карбонилированных белков, образование металл-катализируемых карбонилированных белков и битиروزина.

Результаты. Установлено, что характерным проявлением окислительного стресса в восстановительном периоде после остановки кровообращения и реанимации бывает реципрокность отношений между уровнями липопероксидации и окислительной модификации белков. Для высокоустойчивых к гипоксии животных характерна высокая устойчивость белков ткани почек к свободнорадикальному окислению на фоне высокого уровня перекисного окисления липидов. Напротив, у животных, неустойчивых к гипоксии, на фоне относительно низких значений липопероксидации регистрировали высокие уровни показателей окислительного модифицирования белков, как исходные, так и индуцированные.

Вывод. В постреанимационном периоде у высокоустойчивых к гипоксии животных в почках происходит выраженная активация липопероксидации, сопровождающаяся транзиторным повышением карбонилирования белков в ранние сроки наблюдения; для низкоустойчивых к гипоксии животных характерна высокая интенсивность карбонильного стресса на фоне относительной «сохранности» липидных структур клетки, сохраняющаяся в течение всего постреанимационного периода, что может вносить существенный вклад в повреждение почек, повышая риск развития почечной недостаточности.

Ключевые слова: ишемия почек, перекисное окисление липидов, резистентность тканей к гипоксии, эксперимент.

EFFECT OF HYPOXIA TOLERANCE ON THE RELATION BETWEEN INDICATORS OF FREE RADICAL OXIDATION OF LIPIDES AND PROTEINS IN MURINE KIDNEYS DURING THE POST-RESUSCITATION PERIOD

G.A. Bayburina, E.A. Nurgaleeva, E.F. Agletdinov, A.F. Samigullina
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Aim. Study of the relationship between the parameters of free radical oxidation of proteins and lipids in the murine kidneys in the post-resuscitation period after stopping the systemic circulation, depending on their resistance to hypoxia.

Methods. The systemic circulation was stopped by intra-thoracic clamping of the neurovascular bundle for 5 minutes, performed under general ether anesthesia in male noninbred white rats, divided after testing into two groups based on resistance to hypoxia. The observation period lasted for 35 days. In the homogenates of kidney tissues, the content of products reactive to thiobarbituric acid, carbonylated proteins, the formation of metal-catalyzed carbonylated proteins and bitirozin were determined.

Results. The characteristic manifestation of oxidative stress in the recovery period after stopping blood circulation and resuscitation was found to be reciprocity of the relationship between the levels of lipoperoxidation and oxidative modification of proteins. Highly resistant to hypoxia animals were characterized by high resistance of proteins of kidney tissue to free radical oxidation against the background of high levels of lipid peroxidation. On the contrary, in animals non-resistant to hypoxia, against the background of relatively low values of lipoperoxidation, high levels of oxidative modification of proteins, both initial and induced, were recorded.

Conclusion. In post-resuscitation period in highly resistant to hypoxia animals, marked activation of lipoperoxidation occurs accompanied by a transient increase in the carbonylation of proteins in the early observation period; for low-resistant to hypoxia animals high intensity of carbonyl stress against the background of the relative «preservation» of lipid structures of the cell is characteristic, which persists throughout the post-resuscitation period, which can make a significant contribution to kidney damage, increasing the risk of renal failure.

Keywords: kidney ischemia, lipid peroxidation, tissue resistance to hypoxia, experiment.

Согласно современным представлениям, в состоянии окислительного стресса атаке активных форм кислорода подверга-

ются не только фосфолипиды, но и белки плазматических мембран, что приводит к их деполимеризации и лизису клеток. Карбонильный стресс считают наиболее тяжёлым проявлением окислительного

стресса, при котором инициируются воспалительные, аутоиммунные повреждения, некротическая или апоптотическая гибель клетки [1], а окислительную модификацию белков наряду с липидной перекисидацией рассматривают как один из важнейших маркеров повреждения ткани [2]. По этой причине оценка соотношения между интенсивностью липоперекисидации и окислительной модификации белков чрезвычайно важна для комплексной характеристики процессов свободнорадикального окисления и его проявлений.

Ведущий фактор, определяющий интенсивность процессов окислительной деструкции биомолекул, — напряжённость энергетических кислород-зависимых процессов в клетке. Известно, что низкоустойчивые (НУ) к гипоксии животные по сравнению с высокоустойчивыми (ВУ) характеризуются более высоким уровнем потребления кислорода, что влечёт за собой и более высокий уровень свободнорадикального окисления [3]. Для НУ животных характерны более высокая активность микросомального окисления и более высокий уровень перекисного окисления липидов в микросомах [4].

Почки в силу своих анатомо-физиологических особенностей весьма чувствительны к ишемически-гипоксическому повреждению [5, 6]. Резкое усиление продукции активных форм кислорода при реперфузии неизбежно приводит к развитию окислительного стресса [7], интенсивность которого в свою очередь зависит от индивидуальной устойчивости к гипоксии. Различия в реакции на гипоксические повреждения у ВУ и НУ к гипоксии животных могут приводить к существенным различиям динамики формирования окислительного стресса, а следовательно, определять многие важные особенности течения постгипоксического периода.

Вышесказанное делает актуальным цель настоящей работы — исследование соотношения между показателями свободнорадикального окисления белков и липидов в почках крыс в постреанимационном периоде после остановки системного кровообращения в зависимости от их устойчивости к гипоксии.

Серия экспериментов выполнена на 160 половозрелых самцах неинбредных белых крыс с массой тела 200–220 г. Условия проведения экспериментов для контрольных и опытных групп были идентичными. 950

Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, определённым в приказе Минздрава России №708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики», при проведении исследований неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтверждённой 15.06.2006). Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета Минздрава России.

По итогам тестирования на устойчивость к гипоксии [8] животные были разделены на две группы — НУ и ВУ. Группы включали по 70 опытных и 10 контрольных крыс. Через неделю после тестирования под эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца по методу В.Г. Корпачёва [9]. Реанимацию проводили с помощью наружного массажа сердца и искусственной вентиляции легких. Контрольная группа крыс после тестирования на устойчивость к гипоксии подвергалась эфирному наркозу без моделирования аноксии.

Период наблюдения составлял 35 дней. По истечении 1-х, 3-х, 5-х, 7-х, 14-х, 21-х и 35-х суток животных под эфирным наркозом выводили из эксперимента декапитацией. Базальный уровень карбонилирования белков и интенсивность металл-катализируемого окисления определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с последующей спектрофотометрической регистрацией продуктов взаимодействия — динитрофенилгидразонов [10]; железо-зависимое образование битирозина — по методу [11]; продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, — с помощью набора реактивов «ТБК-АГАТ» (фирма ООО АГАТ-МЕД, Москва).

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0. Описательная статистика проводилась в виде медианы значений и межквартильного интервала (Ме [25%; 75%]). При сравнении групп использовали непараметрический метод — критерий (U) Манна–Уитни.

Высокая чувствительность почек к гипоксии и нарушениям гемодинами-

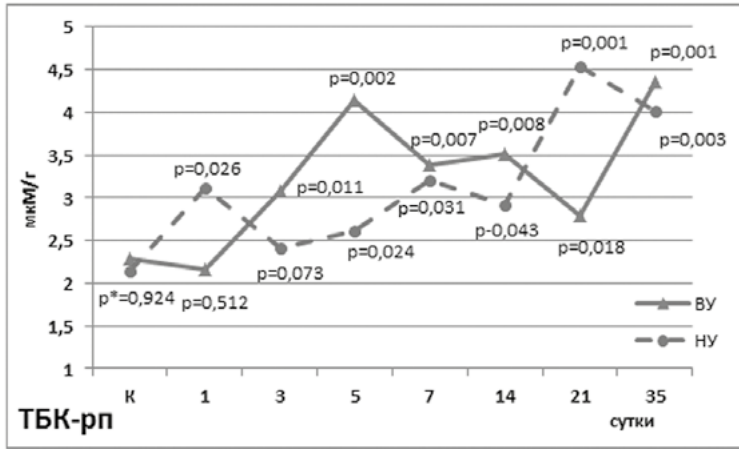


Рис. 1. Динамика содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-рп), в почках в постреанимационном периоде у крыс с различной устойчивостью к гипоксии; р — значимость различий по отношению к контролю, р* — уровень значимости межгрупповых различий; ВУ — высокоустойчивые к гипоксии животные, НУ — низкоустойчивые к гипоксии животные

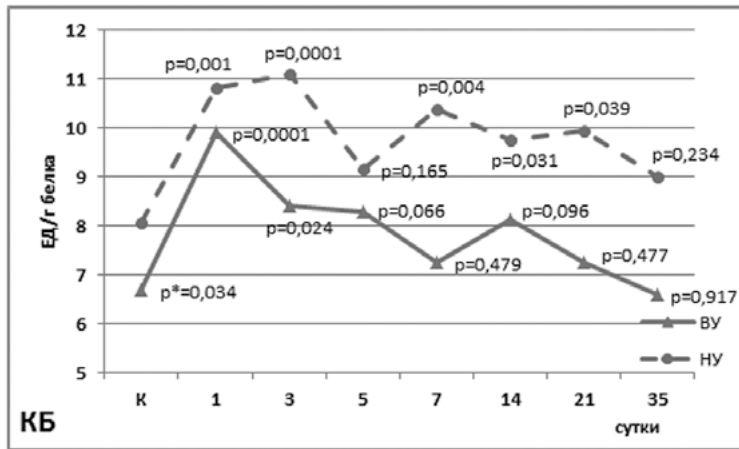


Рис. 2. Динамика карбонилированных белков (КБ) в почках в постреанимационном периоде у крыс с различной устойчивостью к гипоксии; р — значимость различий по отношению к контролю, р* — значимость межгрупповых различий; ВУ — высокоустойчивые к гипоксии животные, НУ — низкоустойчивые к гипоксии животные

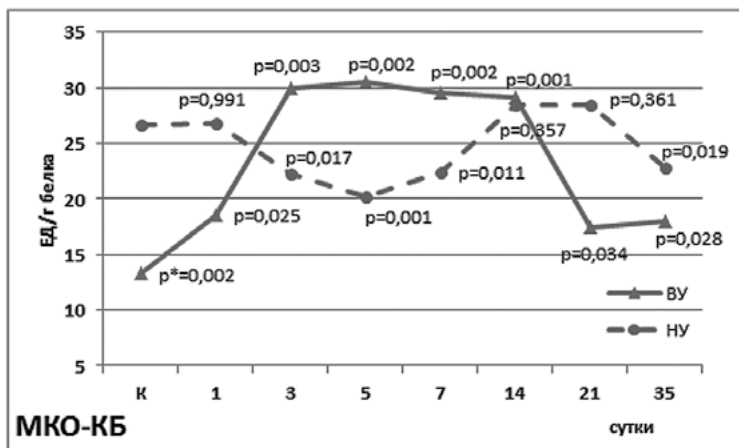


Рис. 3. Динамика металл-катализируемого карбонилирования (МКО-КБ) белков в почках в постреанимационном периоде у крыс с различной устойчивостью к гипоксии; р — значимость различий по отношению к контролю, р* — значимость межгрупповых различий; ВУ — высокоустойчивые к гипоксии животные, НУ — низкоустойчивые к гипоксии животные

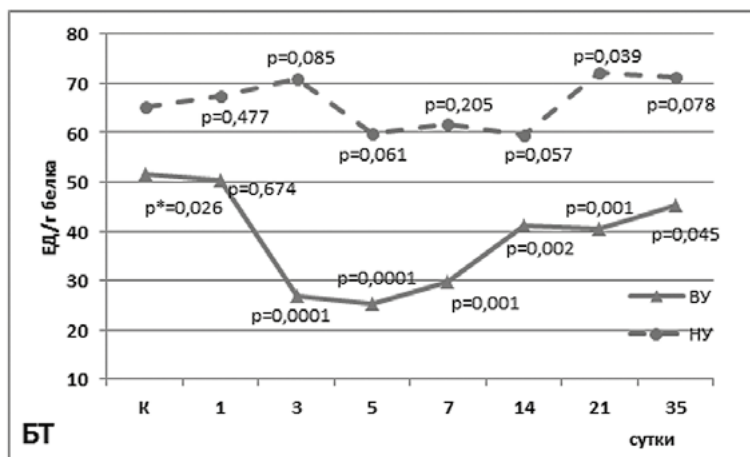


Рис. 4. Динамика образования битирозина (БТ) в почках в постреанимационном периоде у крыс с различной устойчивостью к гипоксии; p — значимость различий по отношению к контролю, p^* — значимость межгрупповых различий; ВУ — высокоустойчивые к гипоксии животные, НУ — низкоустойчивые к гипоксии животные

ки закономерно отразилась на процессах свободнорадикального окисления в постреанимационном периоде. Общая тенденция, характерная как для ВУ, так и для НУ животных, — существенное усиление липопероксидации и окислительной модификации белка. Исходный уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, не имел статистически значимых различий между группами животных с различной устойчивостью к гипоксии (рис. 1).

Дальнейшая динамика липопероксидации имела определённую стадийность, которая зависела от исходной устойчивости к гипоксии. У ВУ к гипоксии животных отчётливое усиление перекисного окисления липидов происходило на ранних сроках постреанимационного периода (вплоть до 5-х суток). В дальнейшем отмечено некоторое ограничение интенсивности перекисного окисления липидов (до 14-х и 21-х суток). И, наконец, на поздних сроках наблюдения (21–35-е сутки) регистрировалось повторное, ещё более выраженное усиление липопероксидации.

В то же время базальные характеристики аэробного метаболизма определяли особенности исходного уровня окислительной модификации белков: НУ животные имели более высокий уровень окислительной модификации белков в сравнении с ВУ, что проявлялось относительно большим уровнем белковых карбониллов (рис. 2, 3) и битирозина (рис. 4).

Динамика интенсивности перекисного окисления липидов у НУ к гипоксии животных имела особенности: за исключением

его ограничения на 3-и сутки эксперимента, прослеживается отчётливая тенденция к постепенному накоплению продуктов липопероксидации с достижением максимального уровня на поздних сроках (21-е и 35-е сутки).

Исходные отличия в уровне окислительной модификации белков у НУ к гипоксии животных сохранялись в течение всего периода наблюдения. При этом уровень маркеров окислительной модификации белков (как карбонилированных белков, так и битирозина) превышал значения соответствующих показателей животных с высокой устойчивостью к гипоксии.

Кроме того, для ВУ к гипоксии животных была характерна нормализация процессов окислительной модификации белков на поздних сроках наблюдения: уровни карбонилированных белков и битирозина на 21-е и 35-е сутки наблюдения статистически значимо не отличались от контрольного уровня. Более того, уровень битирозина в почках ВУ животных с 3-х по 7-е сутки наблюдения был несколько ниже, а у НУ животных стабильно сохранялся на уровне, превышающем контрольные значения, вплоть до окончания эксперимента.

Таким образом, на поздних сроках наблюдения в почках выявляются проявления окислительного стресса, которые варьируют в зависимости от генетически детерминированных особенностей аэробного метаболизма. У ВУ к гипоксии животных окислительный стресс проявляется только усилением липопероксидации. У НУ к гипоксии животных на поздних сроках

постреанимационного периода в почках сохраняются высокие уровни как продуктов перекисного окисления липидов, так и окислительной модификации белков.

Наиболее интенсивное формирование окислительно-модифицированных белков, как и других продуктов свободнорадикального окисления, проходит вблизи центров образования активных форм кислорода и в местах депонирования металлов. Свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что приводит к агрегации или фрагментации белковой молекулы [12].

При высоком внутриклеточном и внеклеточном уровне окислительной модификации белков проявляется её негативное значение. Увеличение содержания карбонилированных белков возможно в результате их повышенной продукции или при снижении скорости их элиминации [13], то есть резкое увеличение уровня окислительной модификации белков может сформироваться в результате определённого дисбаланса между генерацией и элиминацией карбонилированных белков. При окислительном стрессе, когда он носит хронический характер, окисленные белки и пептиды больше подвержены протеолизу [10]. Активными карбонильными соединениями являются соединения, содержащие альдегидные и карбонильные группы (глиоксаль, метилглиоксаль, 3-гидроксиглуконзон), а также малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль, возникающие при перекисном окислении липидов [14]. Вышеперечисленные соединения модифицируют аминокислотные остатки белков и азотистые основания нуклеиновых кислот, меняя свойства этих важнейших биомолекул.

ВЫВОДЫ

1. В постреанимационном периоде у высокоустойчивых к гипоксии животных в почках происходит выраженная активация липопероксидации, сопровождающаяся транзиторным повышением карбонилирования белков в ранние сроки наблюдения.

2. Для низкоустойчивых к гипоксии животных, напротив, характерна высокая интенсивность карбонильного стресса на фоне относительной «сохранности» липидных структур клетки, сохраняющаяся в течение всего постреанимационного периода,

что может вносить существенный вклад в повреждение почек, повышая риск развития почечной недостаточности.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Curtis J.M., Hahn W.S., Long E.K. et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012; 23 (8): 399–406. DOI: 10.1016/j.tem.2012.05.008.
2. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях. *Совр. пробл. токсикол.* 2005; 3: 20–26. [Gubskiy Yu.I., Belenichev I.F., Levitskiy E.L. et al. Toxicologic consequences of oxidative modification of proteins in different pathologies. *Sovremennyye problemy toksikologii.* 2005; 3: 20–26. (In Russ.)]
3. Лукьянова Л.Д. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации. *Патогенез.* 2008; 6 (3): 4–12. [Luk'yanova L.D. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia. *Patogenez.* 2008; 6 (3): 4–12. (In Russ.)]
4. Грек О.Р., Ефремов А.В., Шараров В.И. *Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков.* М.: ГЭОТАР-Медиа. 2007; 120 с. [Grek O.P., Efremov A.V., Shararov V.I. *Gipobaricheskaya gipoksiya i metabolizm ksenobiotikov.* (Hypobaric hypoxia and metabolism of xenobiotics.) Moscow: GEOTAR-Media. 2007; 120 p. (In Russ.)]
5. Lash L.H., Cummings B.S. *Mechanisms of toxicant-induced acute kidney injury. Comprehensive toxicology — renal toxicology.* Oxford: Elsevier. 2010; 81–116.
6. Sabbahy E.M., Vaidya V.S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2011; 3 (5): 606–618. DOI: 10.1002/wsbm.133.
7. Rodriguez F., Bonacasa B., Fenoy F.J., Salom M.G. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19 (15): 2776–2794.
8. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З. и др. *Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных.* Патент на изобретение РФ №2563059. Бюлл. №26 от 20.09.2015. [Bayburina G.A., Nurgaleeva E.A., Shibkova D.Z. et al. *A method of investigation of resistance to hypobaric hypoxia of small laboratory animals.* Patent for invention RF №2563059. Bulletin №26 issued at 20.09.2015. (In Russ.)]
9. Корпачёв В.Г., Лысенков С.П., Телль Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терап.* 1982; 3: 78–80. [Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tell' L.Z. Modelling of clinical death and post-resuscitation disease in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 1982; 3: 78–80. (In Russ.)]
10. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, создание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты.* СПб.: Медицинская пресса. 2006; 397 с. [Dubinina E.E. *Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok*

(*zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie*). *Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty*. (Products of metabolism of oxygen in functional activity of cells (the life and death, creation and destruction). Physiological and biochemical aspects.) Saint Petersburg: Meditsinskaya pressa. 2006; 397 p. (In Russ.)]

11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации*. СПб.: Фолиант. 2000; 104 с. [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. *Metody otsenki svobodnoradikal'nogo okisleniya i antioksidantnoy sistemy organizma*. Metodicheskie rekomendatsii. (Methods of assessment of free radical oxidation and antioxidant system of the organism. Methodological guidelines.) Saint Petersburg: Foliant. 2000; 104 p. (In Russ.)]

12. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. *Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты*. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». 2001; 343 с. [Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. *Okislitel'nyy stress. Biokhimicheskiy i patofiziologicheskiy aspekt*. (Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects.) Moscow: MAIK «Nauka/Interperiodika». 2001; 343 p. (In Russ.)]

13. Tsvetkov A.S., Samsonov S.A., Akhmanova A. et al. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 2007; 64: 519–530. DOI: 10.1002/cm.20201.

14. Miyata T., De Strihou C., Kurokawa K. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of «carbonyl stress» in long-term uremic complications. *Kidney Int*. 1999; 55 (2): 389–399. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00302.x.

УДК 616.12-008.331.1: 616.316-008.8: 612.351.11: 615.065

© 2017 Вавилова Т.П. и соавторы

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Татьяна Павловна Вавилова¹, Ирина Геннадьевна Островская¹,
Гульшат Фасимовна Ямалетдинова^{1*}, Наталья Евгеньевна Духовская¹,
Гаджи Джалалутдинович Ахмедов¹, Зайнаб Абдурахмановна Алигшишева²

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова,
г. Москва, Россия;

²Лосино-Петровская центральная городская больница, г. Москва, Россия

Поступила 09.10.2017; принята в печать 24.10.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-954

Цель. Выявить влияние лекарственных препаратов на функциональное состояние слюнных желёз у пациентов с гипертонической болезнью.

Методы. Обследованы 38 пациентов с гипертонической болезнью. В зависимости от назначенной лекарственной терапии они были разделены на четыре группы: первая группа — принимали ингибитор ангиотензин-превращающего фермента; вторая группа — принимали β-адреноблокатор; третья группа — принимали блокатор медленных кальциевых каналов; четвёртая группа — принимали статины. Для анализа состояния слюнных желёз рассчитывали скорость слюноотделения, определяли водородный показатель (рН) смешанной слюны и активность лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, аспартаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы.

Результаты. В смешанной слюне пациентов с гипертонической болезнью скорость слюноотделения снижалась у больных, принимающих статины. Значения рН слюны во всех группах были в пределах нейтральных значений — от 6,80 до 7,04. Количество общего белка повышено у пациентов, принимающих ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и статины, и снижено у пациентов, принимающих β-адреноблокаторы и блокаторы медленных кальциевых каналов. Высокая активность лактатдегидрогеназы и аспартаминотрансферазы выявлена у пациентов, принимающих статины, что свидетельствует об активации анаэробных бактерий и воспалительных процессах в полости рта. Повышение активности щелочной фосфатазы, отмеченное у пациентов, принимающих β-адреноблокаторы, позволяет судить о возможном нарушении процессов минерализации эмали. Высокая активность щелочной фосфатазы и аспартаминотрансферазы в смешанной слюне исследуемых пациентов совпадает с увеличением папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса до 27±4,6%, что свидетельствует о развитии патологии в тканях пародонта.

Вывод. У пациентов, принимающих статины, существенно угнеталась функция слюноотделения; увеличение активности лактатдегидрогеназы и аспартаминотрансферазы в смешанной слюне свидетельствует об активации анаэробной микрофлоры и распаде тканевых белков в полости рта.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, смешанная слюна, ферменты, побочные действия лекарственных средств.

STUDY OF THE INFLUENCE OF MEDICINAL PREPARATIONS ON THE INDICATORS OF MIXED SALIVA IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION

T.P. Vavilova¹, I.G. Ostrovskaya¹, G.F. Yamaletdinova¹, N.E. Dukhovskaya¹, G.D. Akhmedov¹, Z.A. Aligishieva²

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia;

²Losino-Petrovskaya Central City Hospital, Moscow, Russia

Aim. To identify the effect of drugs on the functional state of the salivary glands in patients with essential hypertension.