
ВЛИЯНИЕ ОПИОИДОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ В ПОЧКАХ ПРИ NO-ИНДУЦИРУЕМОМ АПОПТОЗЕ

И.А. Комаревцева, Е.В. Комаревцева

Кафедра медицинской химии ЛГМУ
Квартал 50-летия Оборона Луганска, Луганск, Украина, 19104

Ю.А. Белоус

Кафедра психотерапии и наркологии ФПКМР
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3, Москва, Россия, 117198

Изучено влияние даларгина на активность ферментов СОД и ЛДГ в клетках почек при гиперпродукции оксида азота. В эксперименте установлено нарушение активности ферментов: активация анаэробного гликолиза и угнетение антиоксидантной системы. Даларгин оказывал положительное действие — антигипоксическое и антирадикальное — на активность ЛДГ и СОД в клетках почек при гиперпродукции оксида азота.

Ключевые слова: даларгин, СОД, ЛДГ, оксид азота, почки.

Образование свободных радикалов — постоянно происходящий в организме процесс, физиологически сбалансированный за счет активности эндогенных антиоксидантных систем. Однако при экстремальном увеличении продукции свободных радикалов вследствие прооксидантных воздействий и роли несостоятельности антиоксидантной защиты развивается окислительный стресс, сопровождающийся повреждением белков, липидов и ДНК [2].

Оксид азота является самым стабильным из свободных радикалов. Превращение NO из физиологического регулятора в токсический агент происходит в результате взаимодействия NO с супероксиданионом и образования ONOO⁻ (пероксинитрита) [7], который сам и продукты его распада протонированной формы повреждают или разрушают биологические структуры путем их окисления.

Эндогенные окислительные повреждения макромолекул играют ведущую роль в развитии целого ряда заболеваний.

В настоящее время установлено, что ряд почечных патологий протекает с нарушением синтеза и/или выделения NO [3]. Как было установлено в наших исследованиях [5], экспериментальная острая почечная недостаточность (ОПН) сопровождается гиперпродукцией NO. Наиболее распространенное в физиологических условиях проявление цитотоксического действия NO — это инициация апоптоза [10]. Также высокие дозы NO вызывают некроз клетки, что связано, прежде всего, с подавлением митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. Поэтому решающее значение для проявления индуцированного NO апоптоза и/или некроза имеет состояние микроокружения клетки и уровень активности ферментов, противостоящих окислительному стрессу (супероксиддисмутаза, глутатионредуктазы, каталазы).

Однако, в отличие от некротической гибели, апоптоз является процессом, требующим энергии для макромолекулярного синтеза, и при его развитии не происходит снижение уровня АТФ до наступления стадии необратимых морфологических изменений [4].

Установлено, что даларгин может проявлять прямое действие на процессы свободно-радикального окисления [1] и влиять на энергетические процессы в ишемизированных тканях [6]. Поэтому нами было изучено влияние даларгина на активность супероксиддисмутазы (СОД) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клетках почек при NO-индуцируемом апоптозе.

Материалы и методы. Исследования выполнены на белых крысах 16—18-недельного возраста. Проведено 3 серии опытов. I серию составляли контрольные крысы ($n = 10$), которым вводили физ.раствор. Во II серии ($n = 10$) у животных формировали ОПН путем внутримышечного введения 50% раствора глицерина в объеме 10 мл на 1 кг массы тела. В III серии ($n = 10$) животным вводили даларгин в дозе 100 мг/кг в течение 1, 2 и 3 суток до инъекции глицерином.

Животных декапитировали на 1-е, 2-е и 3-и сутки. Затем извлекали почки, гомогенизировали их в сахарозной среде ($pH = 7,4$) с последующим выделением методом дифференциального центрифугирования цитозольной и митохондриальной фракций. Биохимически определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в цитозольной фракции и супероксиддисмутазы (СОД) в митохондриальной фракции.

Достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. «Глицериновая» модель ОПН, как было показано в наших ранних исследованиях [5], сопровождалась гиперпродукцией оксида азота в клетках почечной ткани во всех экспериментальных группах. Следовательно, при данной почечной патологии развивался окислительный стресс (ОС) с накоплением в ткани свободных радикалов, в том числе супероксид-аниона (O_2^-) и оксида азота (NO).

Результаты данного исследования приведены в табл. 1, из которой следует, что у подопытных животных экспериментальная ОПН вызывала выраженное нарушение активности ЛДГ и СОД: возрастание степени анаэробного гликолиза и угнетение антиоксидантной системы. Так, на 1-е сутки развития ОПН (II группа) активность ЛДГ повышалась на 4,9% по сравнению с контролем, на 2-е сутки — на 9,45% и на 3-и сутки — на 6,5%.

Установлено, что в митохондриях клеток-мишеней оксид азота в первую очередь ингибирует окислительное фосфорилирование. Это происходит, так как NO обратимо связывается с цитохромоксидазой митохондрии. С другой стороны, подавление электронного транспорта в митохондрии приводит к генерации супероксида и образованию пероксинитрита, который подавляет ферменты дыхательной цепи уже необратимо, нитрозилируя их. Подавление митохондриального дыхания может инициировать апоптотический процесс. Но также известно, что при блокировании гликолиза NO-индуцированное подавление дыхания приведет скорее к некрозу, чем к апоптозу [8].

Таблица 1

Влияние даларгина на активность ЛДГ и СОД в клетках почечной ткани при «глицериновой» модели ОПН

Серии опытов	ЛДГ, нмоль/л · с	СОД, ед. акт.
ОПН (II)		
Контроль (n = 10)	2602 ± 66,32	33,95 ± 0,33
1-е сутки (n = 10)	2730 ± 155*	12,5 ± 1,47*
2-е сутки (n = 10)	2,843 ± 150*	6,6 ± 0,84*
3-е сутки (n = 10)	2772 ± 119*	13,05 ± 0,89*
ОПН + даларгин (III)		
1-е сутки (n = 10)	2252 ± 114**, *	12,65 ± 0,59*
2-е сутки (n = 10)	2550 ± 114**	8,6 ± 0,89**, *
3-е сутки (n = 10)	2310 ± 105**, *	24,4 ± 1,28**, *

Примечание: * — достоверность различий между I и II, I и III группами (p < 0,05—0,01); ** — достоверность различий между II и III группами (p < 0,05—0,01)

Анализируя полученные данные, можно заключить, что в группе одно- (на 4,9%) и трехсуточных (на 6,5%) животных такое увеличение активности ЛДГ указывает на незначительное разобщение окисления глюкозы и окислительного фосфорилирования в клетках почечной ткани. При этом клеточная гибель протекает по типу апоптоза. В группе двухсуточных животных (на 9,45%) прослеживается также участие некроза в процессе клеточной гибели.

Параллельно с активацией гликолиза в клетках почечной ткани происходило резкое снижение активации СОД. На 1-е сутки этот показатель понижался по сравнению с контролем на 21,5 ед. акт., на 2-е сутки — на 27,35 ед. акт., на 3-и сутки — на 20,9 ед. акт. (II группа). В условиях ОС антиоксидантная система клетки не справлялась со своей функцией и была сильно угнетена.

Синтетический аналог лей-энкефалина улучшал показатели активности ферментов у крыс в экспериментальных группах (III) по сравнению с экспериментальными группами (II). Результатом его антигипоксического действия явилось снижение интенсивности анаэробного гликолиза в клетках почечной ткани на фоне развития ОПН (табл. 1). Это является логическим результатом того, что в данных условиях в клетках ткани наблюдается резкое снижение уровня NO [5]. Параллельно наметилась тенденция и к увеличению активности СОД. Наибольшее значение этого показателя приходилось на группу 3-суточных животных (увеличение на 10,6 акт. ед.). Следовательно, была получена положительная динамика антирадикального эффекта даларгина.

Таким образом, в нашем эксперименте показано положительное действие энкефалинов на активность ЛДГ и СОД в клетках почек в условиях повышенного уровня оксида азота, что заслуживает дальнейших клинико-экспериментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Александрова В.А., Рычкова С.В. Даларгин. Фармакологические и клинические аспекты // Ж. Педиатрия. — 1993. — № 3. — С. 101—104.
- [2] Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Перспективы определения 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в качестве биомаркера окислительного стресса в эксперименте и клинике // Вестник РАМН. — 2002. — № 2. — С. 45—49.

- [3] *Майданник В.Г., Малкоч А.В.* Значення окису азоту в клітинній нефрології // Акт. питанья нефрол. Зб. наук.праць. — 1999. — Вип. 3. — С. 30—44.
- [4] *Матышевская О.П.* Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза // Укр. биохим. журнал. — 1998. — № 5. — С. 15—27.
- [5] *Орлова Е.А.* Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности // Укр. журнал экстрем. медицины. — 2002. — № 1. — С. 79—82.
- [6] *Сабатини Р.О.* Роль даларгіну в патогенетичній терапії серцево-судинних захворювань // Мед. хімія. — 2001. — № 4. — С. 82—86.
- [7] *Соловьев А.И., Стефанов А.В.* Фармакология и токсикология оксида азота: «два лица» одной и той же молекулы // Ж. мед. токсикология. — 2000. — Т. 4. — С. 49—57.
- [8] *Crow J., Beckman J.* The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity // In: The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology. — 1995. — P. 57—73.
- [9] *Garthwaite J., Boulton C.* Nitric oxide signalling in the central nervous system // Annu. Rev. Physiol. — 1998. — P. 683—706.
- [10] *Messmer U.K., Lapertina E.C.* Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 244.7 macrophages if antagonized by protein kinase C- and protein kinase A — activating compounds // Mol. Pharmacol. — 1996. — P. 757—765.

INFLUENCE OF OPIOIDS ON ACTIVITY OF ENZYMES IN KIDNEYS AT NO-INDUCED APOPTOSIS

I.A. Komarevtseva, K.V. Komarevtseva

Department of medical chemistry LGMU
50 let Oboroni Luganska boulevard, Lugansk, Ukraina, 91045

Y.A. Belous

Department of psychotherapy and narcology FIPMS
Peoples' Friendship University of Russia
Mikluho-Maklaya str., 21, k. 3, Moscow, Russia, 117198

The influence of dalarginum on activity of enzymes SOD and LDG in cells of a kidney is investigated at the production of nitric oxide. In experiment the infringement of enzymes activity is installed: the activation of anaerobic glycolysis and oppression of the antioxidant system. Positively action of dalarginum — antihypoxiq and antiradical — on the activity LDG and SOD in cells of a kidney at the production of nitric oxide is received.

Key words: dalarginum, SOD, LDG, nitric oxide, kidney.