

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КРЕАТИН-КРЕАТИНКИНАЗНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ В ПРИСУТСТВИИ ПРИРОДНОГО АДАПТОГЕНА КРЕАТИНА

THE EFFECT OF X-RAY IRRADIATION ON THE CREATINE-CREATINE KINASE SYSTEM OF THE LIVER IN THE PRESENCE OF THE NATURAL ADAPTOGENE CREATINE

Л. С. Нерсесова, М. С. Петросян, Ж. И. Акопян

L. Nersesova, M. Petrosyan, J. Akopian

*Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения,
г. Ереван, Республика Армения*

marypetrosyan1990@gmail.com

*Institute of Molecular Biology of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia,
Yerevan, Republic of Armenia*

Изучено влияние рентгеновского излучения на креатин-креатинкиназную систему печени крыс в присутствии природного адптогена креатина. Целью данной работы было оценить состояние Кр-КК-ой системы печени в присутствии природного адптогена Кр-а при однократном общем облучении крыс в дозах 6,3 Гр, равной ЛД_{70/30} и 4,5 Гр. На основании полученных данных показана, что Кр-КК система печени обладает нативными адаптационными свойствами к рентгеновскому излучению, которые значительно стимулируются Кр-ой добавкой. Приведенные данные свидетельствуют о радиомодифицирующем действии Кр на Кр-КК систему, способствующую адаптации энергетического обмена гепатоцитов к воздействию рентгеновского излучения.

The effect of X-rays on the creatine-creatine kinase system of rat liver in the presence of the natural adaptogene Creatine has been studied. The aim of this work was to assess the state of the Cr-CK system of the liver in the presence of the natural adaptogene Cr with a single total irradiation of rats at a dose of 6.3 Gy equal to LD_{70/30} and 4.5Gy. On the basis of the data obtained, it was shown that the liver Cr-CK system has native adaptive properties to X-rays, which are significantly stimulated by the Cr suppliment. These data demonstrate the radiomodifying effect of Cr on the Cr-CK system, which contributes to the adaptation of the energy metabolism of hepatocytes to the effects of X-rays.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, креатин-креатинкиназная система, креатинкиназа, печень, гепатоциты, крысы.

Keywords: x-ray irradiation, creatine-creatine kinase system, creatine kinase, liver, hepatocytes, rats.

Креатинкиназа (КК; НФ 2.7.3.2.) вместе со своими субстратами креатином (Кр) и креатинфосфатом (КФ) образует Кр-КФ-КК-ую систему, которая наряду других функций в энергетическом обмене клетки, поддерживает стабильность митохондриальных мембран [1; 2]. Поддерживая необходимые уровни активности дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, Кр обладает антиоксидантными свойствами. Кроме того, митохондриальная КК оказывает протекторное действие на открытие митохондриальных временных проницаемых пор, а следовательно, влияет на процессы апоптоза и некроза [1]. Именно антиоксидантные и антиапоптотические свойства Кр лежат в основе его протекторного действия при нейродегенеративных и миопатических заболеваниях, старении и действии стрессорных факторов, в основе патофизиологии которых находятся аналогичные молекулярные механизмы окислительного стресса [1–3]. Основную часть необходимого Кр организм человека получает через пищу, а оставшаяся часть синтезируется в самом организме. Печень – основное место синтеза Кр, который затем через кровь транспортируется в Кр-содержащие ткани, клетки которых поглощают его с помощью специфического Кр-транспортера [3].

Ионизирующее излучение (ИИ) оказывает на клетки как прямое действие, вызывая разрывы химических связей в макромолекулах, в том числе и ферментных белках, так и опосредованное, обусловленное образованием свободных радикалов, которые агрессивно взаимодействуют с макромолекулами [5]. В результате этого имеют место изменения, как в уровнях активности, так и в биосинтезе ферментов, что служит основанием для использования анализа активности ферментов для оценки влияния ионизирующего излучения.

Учитывая это, а также антиапоптотические и антиоксидантные свойства Кр, целью данной работы было оценить состояние Кр-КК-ой системы печени в присутствии природного адптогена Кр-а при однократном общем облучении крыс в дозах 6,3 Гр, равной ЛД_{70/30} и 4,5 Гр.

В двух сериях отдельных опытов использовано 60 и 72 белых беспородных крыс-самцов, соответственно, весом 180–210 г, которые содержались в стандартных условиях. Общее однократное облучение крыс проводили на рентгеновской установке «РУМ-17» (напряжение 200 киловольт, сила тока 20 миллиампер, Cu-Al фильтр; кож-

но-фокусное расстояние 50 см, мощность дозы облучения 1,78 Гр/мин). В первой серии опытов животные были разделены на 1 опытную и 2 контрольные группы по 15 особей в каждой. Пострадиационные эффекты исследовались в 1-е, 7-е, 15-е сутки после лучевого воздействия путем отбора на каждый срок из опытных и контрольных групп по 5 крыс. В первой серии опытов животные были разделены на 1 опытную и 2 контрольные группы по 15 особей в каждой. Опытной группе за 2 недели до и 2 недели после облучения давали рег ос в дозе 1 г/кг веса животного креатин, растворенный в 0,9 % растворе глюкозы, а 2 контрольным группам 0,9 % раствор глюкозы и воду, соответственно. В качестве исходного контроля была использована группа нативных животных. Во второй серии опытов, для оценки адаптационных свойств печеночной Кр-КК системы крыс, выживших через 30 дней после рентгеновского облучения в дозе 6,3 Гр, как в опытных, так и в контрольных группах, были определены изменения в уровнях активности КК и содержания Кр в их печени и сыворотке крови. Животные были разделены на 6 групп, по 12 особей в каждой. Крысам первой и второй опытных групп рег ос в дозе 1 г/кг веса животного давали креатин, растворенный в 0,9 % растворе глюкозы и в воде, соответственно; двум облучаемым контрольным группам – 0,9 % раствор глюкозы и воду, соответственно. В качестве контроля были использованы 2 группы нативных животных, получавших и не получавших раствор креатина в 0,9 % глюкозе, соответственно.

КК-ную активность определяли спектрофотометрически по накоплению продукта реакции креатина [4]. Ферментную активность выражали в мкмоль/г влажной ткани в мин для печени и мкмоль/л.мин для сыворотки крови. Содержание креатина в мкг/г влажного веса печени и в мкг/мл сыворотки определяли спектрофотометрически согласно методу Эннора и Розенберга [5].

Для статистической обработки полученных данных использована программа SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Для наглядного изображения рассчитанные средние и их стандартные отклонения для уровней активности КК и содержания Кр на графиках выражены в % по отношению к контрольному уровню, которым служили соответствующие данные, полученные для интактных животных.

На рис. 1 представлены данные по динамике изменений активности КК (А) и содержания креатина (Б) в печени и сыворотке крови крыс после их однократного общего облучения в дозе 4,5 Гр и влиянию креатиновой биодобавки на эти изменения. Как следует из этих данных, в первые пострadiационные сутки в печени крыс контрольной группы 2, получавших воду, имеет место повышение активности КК примерно на 50 %, тогда как в опытной группе крыс, получавших Кр в растворе глюкозы, и в группе, получавшей 0,9 % раствор глюкозы, активность фермента сохраняется на контрольном уровне (А, а, 1 и 3)). В контрольной интактной группе животных в первые, как и в остальные, пострadiационные сутки, значимых изменений КК-активности не наблюдалось. Развитие пострadiационных эффектов во времени приводит к постепенному повышению КК-ой активности, как в печени крыс контрольных групп, так и опытной группы – до 2-х и более раз на 15 сутки. В отличие от опытной группы 1, компенсаторное повышение активности КК в контрольных группах 2 и 3 в начальные пострadiационные сроки сменяется к 15 суткам определенным снижением активности фермента, что по-видимому связано с истощением нативных адаптационных свойств КК. Можно предположить, что резкое повышение активности КК в печени опытных крыс к этому сроку – в 2,5 раза – связано со сменой механизмов адаптации с краткосрочной, основанной на постсинтетической регуляции активности фермента, на долгосрочную, связанную с экспрессией КК, стимулированной, возможно, и Кр-добавкой. Одновременно с этим в контрольных группах во все сроки содержание креатина в печени достоверно не отличается от контрольного уровня, тогда как в опытной группе во все пострadiационные сроки определяется 15–25 % повышение содержания Кр, обусловленное, по-видимому, обогащением этой группы креатиновой добавкой. (рис. 1, Б, 1). Наблюдаемые небольшие колебания в уровнях активности КК и в содержании Кр в сыворотке крови животных всех групп во все пострadiационные сроки статистически недостоверны (рис. 1 А и Б, а).

Как следует из рис. 2 в опытных группах 1 и 2, животные которых получали Кр в растворе глюкозы и воды, соответственно, как в печени, так и сыворотке крови как активность КК, так и содержание креатина на 30-ый день после облучения остаются все еще повышенными (для сравнения рис. 1в, 15-е пострadiационные сутки). При этом для животных группы 2, получавших водный раствор Кр, это повышение менее выраженное. В связи с этим следует отметить, что острая лучевая болезнь при облучении крыс высокими дозами ионизирующего излучения начинается с 5–10 дня после облучения и разгорается в течение 2–3 недель, а выздоровление затягивается на несколько месяцев. Особый интерес представляют данные относительно контрольных облученных крыс (группа 3), получавших вместо раствора Кр воду, в которой через 30 дней после облучения из 12 животных выжило 3 крысы. У этих выживших животных определяется достоверно повышенный уровень активности печеночной КК (на 20 % по сравнению с интактными крысами) и повышенный уровень содержания Кр как в печени, так и в сыворотке крови. Можно предположить, что в данном случае благодаря нативным адаптационным свойствам Кр-КК системы имели место индуцированные радиационным стрессом эндогенный синтез Кр и экспрессия гена КК, (при высокой степени взаимосвязи изменений этих параметров, что повысило резистентность выживших крыс к облучению. Данные, полученные относительно контрольной группы 4, интактные животные которой получали водный раствор Кр, показывают, что сама по себе длительная креатиновая добавка, по-видимому, стимулирует экспрессию КК в печени интактных крыс, вызывая более чем двухкратное повышение ее активности, соизмеримое с таковым в печени облученных крыс, получавших Кр в 0,9 % растворе глюкозы, на 15 пострadiационные сутки (рис. 1в).

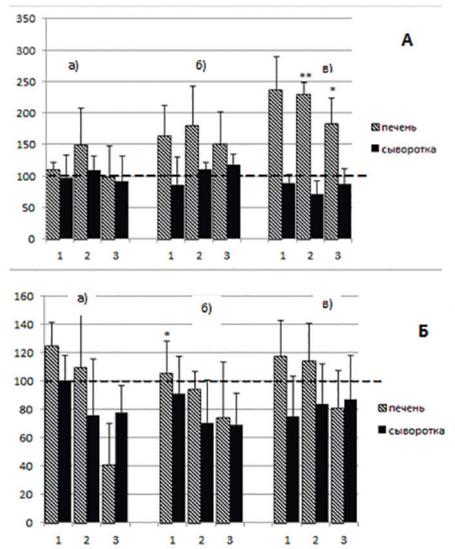


Рисунок 1 – Динамика изменений уровней активности КК (А, в %) и содержания креатина (Б, в %) в печени и сыворотке крови крыс после их однократного общего облучения в дозе 4,5 Гр в присутствии и отсутствии креатина. $n = 5$ для каждой группы животных: 1 – опытная, получавшая креатин в дозе 1 г/кг веса в 0,9 % растворе глюкозы; 2 и 3 – контрольные, получавшие, соответственно воду и 0,9 % раствор глюкозы. Пострадиационные сроки: а – 1-е, б – 7-е, в – 15-е сутки. Пунктирная линия контрольный уровень (интактные крысы), принятый за 100%. *Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05-0,001$

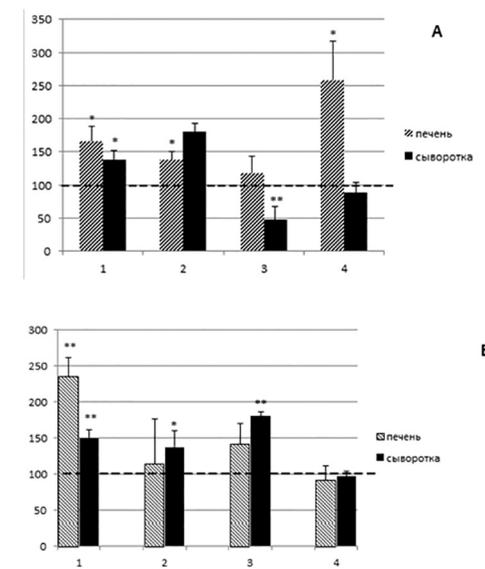


Рисунок 2 – Активность КК (А, в %) и содержания креатина (Б, в %) в печени и сыворотке крыс при применении креатина в дозе 1 г/кг веса крыс за 2 недели до и 2 недели после облучения на 30-е сутки после однократного общего облучения их в дозе 6,5 Гр. $n = 5$ для каждой группы крыс, за исключением группы 3. 1 – опытная, получавшая креатин в дозе 1 г/кг веса в растворе глюкозы; 2 – опытная, получавшая креатин растворенный в воде в дозе 1 г/кг веса; 3 – контрольная облученная группа ($n = 3$), получавшая воду; 4 – интактная группа животных, получавшая креатин растворенный в воде. Пунктирная линия – контрольный уровень (интактные крысы), принятый за 100%. *Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05-0,001$

В заключение на основании представленных данных можно сделать следующие выводы: 1) Кр-КК система печени обладает нативными адаптационными свойствами к рентгеновскому излучению, которые значительно стимулируются Кр-ой добавкой; 2) приведенные данные свидетельствуют о радиомодифицирующем действии Кр на Кр-КК систему, способствующую адаптации энергетического обмена гепатоцитов к воздействию ИИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallimann, T. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine / Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U // Amino Acids. – 2011. – Vol. 40. – № 5. – P. 1271–1296.

2. *Нерсесова, Л. С.* Роль креатинкиназы и ее субстратов в центральной нервной системе в норме и при различных патологиях / Нерсесова Л. С. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 2011. – Т. 47. – № 2. – С. 120–127.
3. *Wyss, M.* Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease – a Bright Future Ahead?/ Wyss M, Braissant O., Pischel I., Salomons G. S. et al.// Subcell. Biochem. 2007. – Vol. 46. – № 17. – P. 309–334.
4. *Петрова, Т. А.* Оптимизация условий определения активности креатинкиназы колориметрическим методом / Петрова Т. А., Лызлова С. Н. // Вестн. ЛГУ. – 1985. – № 24. – С. 88–90.
5. *Ennor, A. H.* Some properties of creatine phosphokinase/ A. H. Ennor, H. Rosenberg // Biochem. J. – 1954. – Vol. 57. – P. 295.

**МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ В АНАЛИЗЕ ХИМИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА**

**THE METHODS OF PROTEOMICS IN ANALYSIS
OF CHEMICALLY MODIFIED HUMAN HEMOGLOBIN**

Е. Я. Рута-Жуковская¹, Д. Д. Шевчук², В. Э. Сяхович^{1,2}, С. А. Беляев¹
E. Ruta-Zhukouskaia¹, D. Shauchuk², V. Syakhovich^{1,2}, S. Beliaev¹

¹*Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Республика Беларусь
sv@antidoping.by*

²*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*

¹*National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus*

²*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В настоящей работе был изучен характер химической модификации основной фракции гемоглобина человека А₁ с использованием глутарового альдегида. В ходе работы были изучены сайты модификации α- и β-субъединиц, и было выявлено, что присоединение глутарового альдегида проходит по поверхностным лизинам. А также были разработаны подходы для определения характера химической модификации гемоглобина человека с использованием тандемной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и протеомики «top-down».

In the present work we studied the nature of chemical modification of the main fraction of human hemoglobin A₁ using glutaraldehyde under mild conditions. In the course of the work, the sites of modification of α- and β-subunits were studied, and it was found that glutaraldehyde attachment proceeds via surface lysines. During the work, approaches were developed to determine the nature of the chemical modification of human hemoglobin using high-resolution tandem chromatography mass spectrometry with «top-down» proteomics procedure.

Ключевые слова: основная форма гемоглобина человека, тандемная хромато-масс-спектрометрия, кровезаменители на основе гемоглобина, глутаровый альдегид.

Keywords: main form of human hemoglobin, tandem chromatography-mass spectrometry, hemoglobin-based oxygen carriers, glutaraldehyde.

В настоящее время постоянно возрастает потребность в трансфузии цельной крови и ее отдельных компонентов как в связи с ростом числа операций по пересадке и транспортировке органов и тканей, так и с увеличением частоты возникновения экстренных ситуаций обусловленных природными факторами. Нехватка донорской крови и наличие ряда ограничений по ее использованию, таких как возможность *заражения инфекционными заболеваниями*, необходимости определения группы крови и резус-фактора, изменение свойств крови и ее компонентов в процессе хранения требуют создания и применения искусственных кровезаменителей. Дефицит донорской крови, особенно редких групп, остро ощущается в чрезвычайных ситуациях, сопряженных с многочисленными жертвами. Альтернативу донорской крови могут составить искусственные кровезаменители, обладающие способностью транспортировать газы крови, прежде всего, кислород и углекислый газ. По сравнению с донорской кровью кровезаменители имеют ряд преимуществ: они не требуют групповой совместимости, свободны от инфекций, обладают длительным сроком годности, что позволяет запасать их в больших количествах и при необходимости использовать немедленно [1].

Из разработанных к настоящему моменту одним из используемых видов кровезаменителей являются кровезаменители на основе гемоглобина – важнейшего компонента крови, обеспечивающего снабжение организма человека кислородом. В настоящее время интенсивно ведутся исследования по использованию гемоглобина, по-