

© А.А.Пепанян, П.А.Казарян, А.У.Асоян, С.С.Дагбашян, 2006
УДК 616.61-092:614.876]-092.4

А.А. Пепанян, П.А. Казарян, А.У. Асоян, С.С. Дагбашян

МЕМБРАННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА ПОЧЕЧНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ РАДИАЦИОННОМ ПОРАЖЕНИИ

A.A. Papanyan, P.A. Khazaryan, A.U. Asoyan, S.S. Dagbashyan

MEMBRANE ASPECTS OF PATHOGENESIS OF RENAL COMPLICATIONS CAUSED BY RADIATION INJURY

Научный отдел гематологического центра Министерства здравоохранения Республики Армения, г. Ереван

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить особенности изменения основных классов мембранных фосфолипидов и активности некоторых мембраносвязанных ферментов (Na/K-, Mg- и Ca-АТФаз, 5'-нуклеотидазы) при лучевой патологии. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования проводились на белых крысах-самцах массой 140-160 г. Животных подвергали однократному общему облучению в дозе 3 Гр. Исследование проводилось на 10-й день после облучения в микросомальной фракции клеток почечной ткани. Фракционирование фосфолипидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Изменение АТФазной и 5'-нуклеотидазной активности регистрировали по приросту неорганического фосфора. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено существенное активирование 5'-нуклеотидазы и усиление общей АТФазной и Mg-АТФазной активности в клетках почечной ткани на фоне статистически достоверного подавления деятельности как Na/K-, так и Ca-АТФазы. Отмеченные изменения сопровождаются значительным снижением содержания фосфатидилхолинов с одновременным повышением уровня фосфатидных кислот, дифосфоглицеринов и фосфатидилсерина. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Ионизирующее облучение характеризуется нарушением деятельности мембраносвязанных ферментов и перераспределением качественного и количественного состава фосфолипидов мембран клеток почечной ткани. Наблюдающееся при этом изменение липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений в мембранах клеток почечной ткани может привести к нарушению функционального состояния почек.

Ключевые слова: почки, ионизирующее облучение, мембрана, 5'-нуклеотидаза, Na/K-, Mg- и Ca-АТФазы, фосфолипиды.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study specific changes of the main classes of membrane phospholipids and activity of some membrane-bound enzymes (Na/K-, Mg- and Ca-ATPases, 5'-nucleotidase) in radiation pathology. **MATERIALS AND METHODS.** The investigation was performed in white male rats with body mass 140-160 g. The animals were exposed to a single 3 Gr dose of general irradiation. On the 10th day after irradiation a microsomal fraction of the renal tissue cells was studied. The phospholipids fraction was performed by the method of thin-layer chromatography. Changes to the ATPase and 5'-nucleotidase activity were registered by the growth of non-organic phosphorus. **RESULTS.** Essential activation of 5'-nucleotidase and enhancement of total ATPase and Mg-ATPase activities in the renal tissue cells was established against the background of statistically reliable inhibition of Na/K-ATPase, as well as Ca-ATPase activities. The changes observed were accompanied by a significant decrease of the content of phosphatidylcholines with a simultaneous increase of the level of phosphatide acids, diphosphoglycerides and phosphatidylserines. **CONCLUSION.** Ionizing irradiation is characterized by a disturbance of the function of membrane-bound enzymes and redistribution of the qualitative and quantitative contents of phospholipids of the renal tissue cell membranes. The changes observed in the lipid-lipid and lipid-protein interrelations in the membranes of the renal tissue cells can cause a disturbance of the functional state of the kidneys.

Key words: kidney, ionizing irradiation, 5'nucleotidase, membrane, Na/K-, Mg- and Ca-ATPases, phospholipids.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы резко повысилось внимание исследователей к нарушениям, возникающим в стабильных (в цитокинетическом отношении) высокодифференцированных тканях, не ответственных за непосредственный исход лучевого поражения. При этом изучается их роль как в процессах восстановления, так и в развитии отдаленных последствий облучения [1, 2]. К числу таких тканей относится и почечная ткань.

Показано, что почка как полифункциональный орган, участвующий в обеспечении гомеостаза внут-

ренней среды организма, кроветворении и обмене веществ, играет важную роль в развитии постлучевой реакции. Хорошо растворимые радиоактивные вещества из крови и тканевой жидкости достаточно быстро фильтруются в почках и выводятся из организма с мочой. При этом происходит облучение ткани почек с последующим развитием в ней перитубулярного некроза, повреждения сосудов, глинизации клубочков, что в итоге приводит к гипертензии и атрофии почек. Между тем нефросклероз и артериолосклеротические повреждения играют важную роль в патогенезе опухолей почек [3-7].

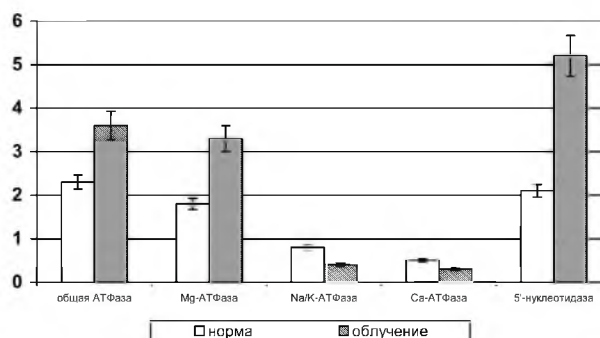
Известно, что в выполнении основных функций почек важное значение имеет состояние мембранных структур почечных клеток. С другой стороны, мембранам на основании их многосторонних функциональных и регуляторных взаимосвязей с клеточным метаболизмом отводится роль одной из мишеней действия радиации на организм [8–11]. В связи с этим для выяснения возможных механизмов нарушения работы почек при лучевом воздействии, равно как и для обоснованного подхода к выбору фармакологических средств терапии, были исследованы мембранные аспекты поражения почечной ткани при данной патологии путем изучения особенностей изменения основных классов мембранных фосфолипидов (ФЛ) и активности некоторых мембраносвязанных ферментов (Na/K-, Mg- и Ca-АТФаз, 5'-нуклеотидазы).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на белых крысах-самцах массой 140–160 г. Животные подвергались однократному общему облучению в дозе 3 Гр с помощью установки РУМ-17 при силе тока – 18 мА, напряжении – 187 кВ, мощности дозы – 0,26 Гр/мин и кожно-фокусном расстоянии – 60 см. Животных забивали на 10-й день после облучения (в разгар лучевой патологии). В исследованиях использовали микросомальные фракции клеток почечной ткани, полученные общепринятым методом дифференциального центрифугирования при 17 000 g.

Активность Na/K- и Ca-АТФаз определяли по разнице между общей и Mg-АТФазной активностями. При этом в случае Na/K-АТФазы измерение проводили в присутствии и отсутствии 0,1 мМ убаина, а в случае Ca-АТФазы – в присутствии и отсутствии 0,1 мМ CaCl_2 [12]. Оценку 5'-нуклеотидазной активности осуществляли по методу L. Muszbek et al. [13]. Изменение АТФазной и 5'-нуклеотидазной активности регистрировали по приросту неорганического фосфора в инкубационной среде, а активности выражали в микромолях $\Phi_{\text{н}}/\text{ч}/\text{мг}$ белка. Содержание белка в пробах определяли по методу О.Н. Lowry et al. [14].

Общие липиды экстрагировались из ацетоновых порошков почечной ткани в смеси растворителей метанол: хлороформ. Фракционирование ФЛ осуществляли методом одномерной тонкослойной хроматографии [15] в модификации П.А. Казаряна [16] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС (Чехия). Для разделения использовали систему растворителей хлороформ – метанол – вода. В каждой фракции определяли содержание липидного фосфора [17], а количество ФЛ выражали в мг $\Phi/\text{г}$ ткани.



Изменение активности мембраносвязанных ферментов в почечной ткани при облучении (в микромолях $\Phi_{\text{н}}/\text{мг}$ белка). По горизонтальной оси: общая АТФаза, Mg- АТФаза, Na/K-АТФаза, Ca-АТФаза и 5'-нуклеотидаза. По вертикальной оси: активность мембраносвязанных ферментов в микромолях неорганического фосфора на мг белка. Белые столбики – активность ферментов в норме. Заштрихованные столбики – активность на 10-й день после ионизирующего облучения.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с учетом критерия достоверности Фишера-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существенном изменении активности некоторых мембраносвязанных ферментов в почечной ткани при радиационном воздействии (рисунок). Так, показано заметное (на 48,5 %) повышение общей АТФазной активности на 10-й день облучения. На этом фоне отмечается двукратное усиление деятельности Mg-АТФазы.

Согласно полученным данным (рисунок), при облучении наблюдается статистически достоверное подавление активности Na/K- и Ca-АТФаз (на 59,2% и 42,3% соответственно), выступающих в роли ферментных эквивалентов Na-евого и Ca-евого насосов.

Установлено, что наиболее существенным изменениям подвергается активность 5'-нуклеоти-

Таблица 1
Абсолютное содержание индивидуальных и общих фосфолипидов почечной ткани при облучении (в мг $\Phi_{\text{н}}/\text{г}$ ткани)

Фосфолипиды	Норма	Облучение
Лизофосфатидилхолины	27,1 ± 1,2	49,2 ± 1,8 ***
Фосфоинозитиды	45,8 ± 1,2	64,4 ± 1,7 **
Сфингомиелины	102,3 ± 8,5	97,6 ± 3,6
Фосфатидилхолины	337,1 ± 10,0	92,0 ± 4,0 ***
Фосфатидилэтаноламины	209,5 ± 13,1	224,3 ± 5,1
Фосфатидилсерины	41,4 ± 1,7	124,0 ± 3,5 ***
Фосфатидные кислоты	12,1 ± 0,7	92,4 ± 3,9 ***
Дифосфатидилглицерины	15,3 ± 0,5	74,9 ± 5,7 ***
Суммарные фосфолипиды	726,9 ± 28,9	881,9 ± 18,4 *

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; без обозначений – данные статистически недостоверны.

Фосфолипид-фосфолипидные соотношения в почечной ткани при облучении

Фосфолипид-фосфолипидные соотношения	Норма	Облучение
Нейтральные ФЛ / кислые ФЛ	$5,9 \pm 0,8$	$1,30 \pm 0,1^{**}$
Холинсодержащие ФЛ / аминсодержащие ФЛ	$1,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,06^*$
Лизофосфатидилхолины / фосфатидилхолины	$0,1 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,07^{**}$
Фосфатидилхолины / фосфатидные кислоты	$27,9 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,2^{***}$
Фосфатидилэтаноламины / фосфатидилхолины	$0,6 \pm 0,08$	$2,4 \pm 0,1^{***}$
Фосфатидилхолины / сфингомиелины	$3,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,04^{**}$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; без обозначений – данные статистически не достоверны.

дазы: она увеличивается более чем в 2,5 раза по сравнению с нормой ($P < 0,001$).

Выраженные изменения регистрируются и в фосфолипидном спектре почечных клеток облученных крыс (табл. 1). Так, 10-й день радиационного поражения характеризуется увеличением общего пула ФЛ, преимущественно за счет резкого повышения уровней фосфатидных кислот (ФК) (в 7,6 раз), дифосфатидилглицеринов (ДФГ) (в 4,9 раз) и фосфатидилсеринов (ФС) (в 3 раза) по сравнению с контролем. Одновременно наблюдается заметное понижение доли фосфатидилхолинов (ФХ) на фоне увеличения концентрации лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) (в 1,8 раза по сравнению с контролем). В этих условиях не отмечено статистически достоверных изменений в абсолютном содержании сфингомиелинов (СФМ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ). Наблюдается лишь тенденция к увеличению уровня этих соединений.

Согласно полученным данным, наиболее информативными являются изменения коэффициентов ФЛ – ФЛ соотношений в почечной ткани (табл. 2). Ионизирующее облучение сопровождается значительным уменьшением коэффициентов отношений нейтральных ФЛ к кислым; холинсодержащих ФЛ (ФХ + СФМ), дислоцирующихся преимущественно в наружном слое мембраны, к аминсодержащим (ФЭ + ФС), локализованным в ее внутреннем слое; резким снижением коэффициентов отношений ФХ/ФК и ФХ/СФМ с одновременным заметным повышением величины отношений ФЭ/ФХ и ЛФХ/ФХ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований указывают на выраженное подавление активного транспорта ионов натрия, калия и кальция через мембрану почечных клеток при облучении. Как было показано в предыдущих работах [18], это в первую очередь связано с внутриклеточным дефицитом АТФ, ведь на активный транспорт ионов расходуется около 40% последнего. Одним из механизмов

Таблица 2

нарушения активности АТФазы при облучении может явиться и окисление SH-групп ферментов, приводящее к изменению структуры активного центра [19]. Ввиду того, что Mg-АТФаза считается причастной к пассивным транспортным процессам, становится очевидным, что резкое повышение ее активности при облучении обуславливает нарушение соотношения активного и пассивного транспорта в почечных мембранах. В свою оче-

редь накопление ионов кальция в цитоплазме (вследствие угнетения Ca-АТФазы) может служить стимулирующим фактором для активации перекисного окисления липидов и фосфолипаз на уровне мембранных структур клеток, способно модулировать проницаемость мембран, приводя к внутриклеточным потерям физиологически важных ионов калия.

Резкое возрастание активности 5'-нуклеотидазы в почечной ткани при радиационном воздействии, возможно, происходит в результате передислокации фермента в поверхностную мембрану. Согласно некоторым данным [20], увеличение активности 5'-нуклеотидазы сопровождает канцерогенез и старение клеток.

Одной из существенных причин пострадиационного нарушения активности ферментов является трансформация их липидного окружения [8, 21]. Известно, что физиологическая роль липидной фазы мембранных структур заключается в создании микроокружения, обеспечивающего конформационную стабильность мембраносвязанных белков-ферментов.

Резкое снижение уровня ФХ (превалирующих в почечной ткани) при облучении, сопровождающееся одновременным повышением доли ЛФХ, приводит к увеличению величины отношения ЛФХ/ФХ, указывая на активирование процессов деградации мембранных ФЛ-глицеролипидов. ЛФХ, жирные кислоты и продукты перекисаации, образующиеся в процессе деградации ФЛ, принимают участие в патологических механизмах ряда заболеваний, в том числе и нефрологических, вызывая главным образом нарушение проницаемости сосудистых стенок. Они могут осуществлять ингибирование окислительного фосфорилирования, подавление активности Na/K- и Ca-АТФаз, стимуляцию аденилатциклазы, усиление пассивного входа кальция в цитоплазму и другие метаболические нарушения.

В механизме уменьшения количества ФХ не исключается и возможность ингибирования его синтеза из ФК. Отмечающееся при этом значи-

тельное накопление ФК – промежуточных продуктов биосинтеза ФЛ, обусловленное, по-видимому, активацией фосфолипазы Д, может привести к нарушению структуры почечных мембран. ФК, как известно, являются природными ионофорами кальция и вместе с фосфоинозотидами (ФИ) играют существенную роль в мобилизации ионов кальция в клетке, что вызывает нарушение проницаемости и приводит к деструкции мембран.

Обращает к себе внимание достаточно высокое содержание ДФГ в патологически измененной почечной ткани, что, на наш взгляд, является компенсаторным и направлено на поддержание стабильности клеточных мембран за счет взаимодействия ДФГ с белковыми компонентами.

В результате качественных и количественных перестроек отдельных представителей мембранных фосфатидов-глицеридов обеспечивается определенная текучесть мембраны, изменение которой приводит к развитию конформационных нарушений мембранных протеинов. Вследствие этого наблюдаются существенные отклонения в активности как мембраносвязанных ферментов, так и рецепторных белков, утрачивающих свою эффективность в отношении раздражителей.

Одним из показателей повышения микровязкости в условиях патологии считается увеличение соотношения ФЭ/ФХ [22]. По нашим данным, коэффициент этого соотношения в почечной ткани резко возрастает при лучевом поражении (см. табл. 2). Примечательно, что эти результаты коррелируют с полученными нами данными по уменьшению активности мембраносвязанных Na/K- и Ca-АТФаз. Возможно, повышение микровязкости приводит к устранению кооперативных взаимодействий между АТФ-связывающими центрами и предотвращает «сшивание» α -субъединиц исследуемых ферментов, что обуславливает отрицательную кооперативность по субстрату и приводит к снижению их активности.

Необходимо отметить, что несмотря на подавление активности Na/K-АТФазы наблюдается заметное возрастание количества ФС (липидов-эффекторов Na/K-АТФазы). Как известно, для нормального функционирования Na/K- и Ca-АТФаз необходимы также стабильные концентрации ФХ и ФИ [23]. Регистрируемая в этих условиях относительно стабильная концентрация ФЭ позволяет предположить, что последние выступают в роли регулирующего, лимитирующего фактора в реакциях трансформации $ФС \leftrightarrow ФЭ \leftrightarrow ФХ$ в обоих направлениях, что, по всей вероятности, не лишено определенного биологически оправданного значения в процессах регуляции функционального состо-

яния мембран в условиях радиационного поражения. Важно отметить, что ФЭ являются также реактивирующими липидами Mg-АТФазы, в свою очередь играющей немаловажную роль в регуляции проницаемости мембран.

Активность 5'-нуклеотидазы регулируется состоянием текучести наружной половины мембранного бислоя (СФМ/ФХ). Многократное повышение активности фермента в нашем эксперименте, несомненно, обусловлено повышением величины отношения СФМ/ФХ за счет резкого снижения уровня ФХ.

Примечательно, что содержание СФМ в нашем эксперименте не подвергается статистически достоверным изменениям. Вероятно, это обусловлено их относительно меньшей, чем у других ФЛ, степенью обмениваемости. СФМ в мембране играют важную роль в обеспечении гомеостаза холестерина, выступая в клетке в качестве его акцептора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно констатировать, что ионизирующее облучение характеризуется нарушением деятельности мембраносвязанных ферментов и перераспределением качественного и количественного состава ФЛ мембран клеток почечной ткани. Наблюдающиеся при этом изменения липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений сопровождаются существенными пертурбациями со стороны важнейших функций мембранных образований, включая транспортные и мессенджерные процессы, рецепцию эндогенных метаболически активных соединений, механизмы клеточных контактов и др. Это, в свою очередь, может явиться серьезной предпосылкой для нарушения функционального состояния почек при облучении, и следовательно – всего организма в целом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kholodova NB, Kuznetsova GD, Zubovskii GA. The late sequale of radiation exposure of the nervous system. *Zh Nevropatol Psykhiatr Imm SS Korsakova* 1996; 96(5): 29
2. Geraci IP, Jackson KL, Mariano MS et al. Kidney and lung injury in irradiated rats protected from acute death by partial-body shielding. *Rad Res* 1990; 122(1): 95-100.
3. Демин ВБ. Морфометрическая оценка реакции нефронов почки на различные дозы облучения. В: *Клеточно-тканевые механизмы адаптации к действию повреждающих факторов*, Омск, 1990; 74-76
4. Law NP, Ahier RG, Coultas PG. The role of vascular injury in the radiation response of mouse kidney. *Brit J Cancer* 1986; 53[Suppl 7]: 327-329
5. Williams MV. The cellular basis of renal injury by radiation. *Brit J Radiol* 1986; [Suppl 19]: 61-64
6. Prescott DM, Hoopes PJ, Thrall DE. Modification of radiation damage in the canine kidney by hyperthermia: a histologic and functional study. *Radiat Res* 1990; 124(3): 317-325

7. Krochak RJ, Baker DG. Radiation nephritis. Clinical manifestation and pathophysiological mechanisms. *Urologia* 1986; 27(5): 389-396
8. Бурлакова ЕБ, Шишкина ЛР. Роль липидов мембран в пострадиационной модификации лучевого поражения клеток. *Инф Бюл Научн Совещ АН СССР по пробл радиобиол* 1989; 35: 11-12
9. Бездробный ЮВ. Современное состояние вопроса о роли плазматической мембраны в лучевом повреждении клеток млекопитающих. Мат Всес Конф «Актуальные проблемы радиационной биологии и радиационной генетики», Обнинск, 1990: 19-21
10. Кожемякин ЛА, Краевой СА. Молекулярные механизмы воздействия ионизирующих излучений. *Военно-мед журнал* 1993; 4: 33-37
11. Bulanov KJa, Gerasimovich NN, Milyutin AA et al. The effect of low doses g-radiation on membrane structure of cells with various functional specialization. Xth IntCong. of Radiation Research, Abstr., Wizzburg, Germany 1995; 1: 12-13
12. Ratbun WB, Betlach MV. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Analyt Biochem* 1969; 28(1): 436-445
13. Muszbek L, Szabo T, Fesus L. *Analyt Biochem* 1977; 77: 286-288
14. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-270
15. *Хроматография в тонких слоях*. Под ред. Э.Шталя, Москва, 1965; 508
16. Казарян ПА, Элюян ДВ. *Хроматографические методы*. Москва: ЦОЛИУВ, 1982; 40
17. Светашев ВИ. *Микротехника анализа липидов и ее использование*. Автореф дис ... канд хим наук, Владивосток, 1973; 25
18. Пепанян АА, Казарян ПА, Аветисян АА и др. Нарушение биоэнергетических процессов и возможность их коррекции при радиационном поражении. *Нейрохимия* 2002; 19: 235-238
19. Дворецкий АИ, Айрапетян СН, Шаинская АМ, Чеботарев ЕЕ. *Трансмембранный перенос ионов при действии ионизирующей радиации на организм*. Киев, Наукова думка, 1990; 110
20. Нагиев ЭР. Влияние ионизирующей радиации и физической нагрузки на активность 5'-нуклеотидазы печени крыс. *Укр Биохим Журн* 1995; 119(6): 631-633
21. Рыскулова СТ. *Радиационная биохимия плазматических мембран*. Москва, Энергоатомиздат, 1986; 127
22. Karageuzyan KG. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 Feb; 4(1): 85-98
23. Дагбашян СС, Пепанян АА, Казарян ПА и др. Оценка липид-белковых и липид-липидных взаимоотношений при агрессивных неходжкинских лимфомах. *Новое в гематологии и трансфузиологии*, Киев, 2006; 5: 165-169

Поступила в редакцию 19.07.2006 г.