

ВЛИЯНИЕ γ -L-ГЛУТАМИЛГИСТАМИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ПРОЯВЛЕНИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНАФИЛАКТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА И СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМА P-450 ПЕЧЕНИ.

НЕБОЛЬСИН В.Е., КРЖЕЧКОВСКАЯ В.В., ЖЕЛТУХИНА Г.А.,
ЕВСТИГНЕЕВА Р.П., КОВАЛЕВА В.Л.

Государственная академия тонкой химической
технологии им. М. В. Ломоносова, Москва

Исследовано влияние γ -L-глутамилгистамина, синтезированного на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова, на тяжесть проявлений экспериментальной анафилактической реакции (ЭАР), содержание гормонов в сыворотке крови и состояние системы цитохрома P450 печени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемое соединение обладает высокой биологической активностью. Наблюдается индукция системы цитохрома P450 печени, повышается содержание гормонов (тироксина и глюкокортикоидов) в сыворотке крови и снижаются проявления экспериментальной анафилактической реакции.

Ключевые слова: γ -L-глутамилгистамин, экспериментальная анафилактическая реакция, гормоны, цитохром P-450, печень.

ВВЕДЕНИЕ. Продуктами метаболизма биогенных аминов – серотонина, гистамина, таурина и других, могут быть их γ -L-глутамильные производные. Существует мнение, что γ -глутамилирование является основным путем инактивации аминов у простейших, которое осуществляется при участии фермента γ -глутамилтрансферазы (КФ 6.3.2.18) с минимальными энергетическими затратами [1]. В организме млекопитающих также обнаружены γ -L-глутамильные производные аминов, в том числе γ -глутамилгистамин [2], и выявлена в эксперименте и клинических исследованиях высокая биологическая активность γ -L-глутамилтаурина [3].

Целью работы явилось исследование влияния γ -L-глутамилгистамина (γ -L-Glu-NA) на тяжесть проявлений экспериментальной анафилактической реакции (ЭАР), содержание гормонов в сыворотке крови и состояние системы цитохрома P450 печени.

МЕТОДИКА. Синтез γ -L-Glu-NA осуществлен по оригинальной методике с применением методов пептидной химии на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова. Данное соединение полностью охарактеризовано физико-химическими методами анализа: элементным, инфракрасной и масс-спектрометрией, методом протонного магнитного резонанса, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной

хроматографией (ВЭЖХ). Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили в условиях: колонка МПС-270 С-18 (250 мм x 4.0), 10 мкм, элюция 0,1М Na₂HPO₄, рН 2,3. Время выхода индивидуального пика γ -L-Glu-НА 3,50 мин. Масс-спектр снимали на масс-спектрометре биохимическом (г.Сумы, Украина): [M+1H]⁺241,1.

Исследование изменения длительности гексеналового сна (ГС), интегрального показателя состояния системы цитохрома Р450 печени *in vivo*, проводили на мышах-самцах линии BALB/c \times h75, СВА, гибридах первого поколения BDF1 с исходной массой 20 - 22 г, а также беспородных морских свинок-самцах с исходной массой 250 - 300 г. γ -L-Glu-НА вводили перорально в течение 3-х суток в дозах 50 и 500 мкг/кг. Гексенал гидрохлорид в дозе 36 мг/кг массы животного вводили внутрибрюшинно через 24 часа после последнего введения препарата, за исключением мышей линии BALB/c \times h75, которым вводили гексенал в дозе 60 мг/кг в те же сроки, и морских свинок, для которых доза гексенала составляла 30 мг/кг. Длительность ГС определяли в минутах.

Следующие эксперименты проводили на беспородных морских свинок-самцах с исходной массой 250 - 300 г, содержавшихся на стандартном рационе вивария.

γ -L-Glu-НА и препараты сравнения – интал (фармакопейный препарат, Югославия) и фенobarбитал (ФБ, фирмы «Serva», ФРГ), вводили животным перорально трехкратно за 72, 48 и 18 часов до исследований. Контрольная группа животных получала эквивалентное количество физиологического раствора.

Влияние γ -L-Glu-НА на изменение тяжести проявлений ЭАР изучали на модели антиген-индуцированного бронхоспазма у активно сенсibilизированных куриным овальбумином (ОВА, производства фирмы Sigma /grade III/) морских свинок по методу Andersson [4]. Индукцию бронхоспазма и измерение параметров внешнего дыхания проводили по методу, описанному в работе [5]. Разрешающую дозу ОВА (150 - 200 мкг/кг) вводили наркотизированным морским свинкам внутривенно (v. jugularis) в 0,1 мл физиологического раствора на 26 день после сенсibilизации. Измерение параметров дыхания осуществляли с помощью аппарата искусственного дыхания (Ugo Basile) и самописца (Миллихром), регистрирующего амплитуду дыхания. Динамику бронхоспазма наблюдали в течение 30 - 60 минут. Эффективность исследуемого соединения определяли по изменению величины бронхоспазма.

Группы животных: 1 группа – контроль сенсibilизации; 2 группа – животные, получавшие Интал в дозе 5 мг/кг. Животные 3, 4, 5, 7 и 8 групп получали γ -L-Glu-НА перорально в дозах 5, 20, 50, 150 и 500 мкг/кг, соответственно. Морским свинкам 6 группы вводили соединение в дозе 50 мкг/кг, внутрибрюшинно.

С целью изучения изменения состояния монооксигеназной системы печени γ -L-Glu-НА и ФБ вводили животным перорально в дозе 50 мкг/кг и 40 мг/кг, соответственно. Содержание цитохромов Р450 и v_5 измеряли по методу [6] в микросомальной фракции печени, выделенной методом дифференциального центрифугирования [7]. Для определения групп цитохромов Р450В и Р450Л, активные центры которых обращены в водную и липидную фазы, соответственно, использовали приоритетный метод, разработанный М. И. Изотовым [8]. Содержание микросомального белка определяли модифицированным методом Лоури [9].

Изменения гормонального статуса под влиянием γ -L-Glu-НА изучали у интактных и сенсibilизированных морских свинок. Сенсibilизацию животных

осуществляли как описано выше. Кровь для определения гормонов у животных отбирали до начала эксперимента и через 18 часов после последнего введения соединения с 10 до 11 часов на 26 день сенсibilизации. 17-Оксипрогестерон, 11-дезоксикортизол и кортизол определяли радиоиммунологическим методом [10], а тироксин - с использованием набора фирмы "Белорис" в сыворотке крови. Анализ изменения гормонального статуса проводили по индивидуальным показателям для каждого животного в группе. Одновременно проводилось измерение содержания гормонов в группе интактных животных, содержащихся параллельно опытным группам. В начале и конце содержания у интактных животных достоверных изменений количества гормонов в сыворотке крови не выявлено.

Группы животных: 1 группа – интактные животные + γ -L-Glu-NA 50 мкг/кг перорально, 2 группа - сенсibilизированные животные, 3 группа – сенсibilизация + γ -L-Yla-NA 50 мкг/кг перорально; 4 группа - сенсibilизация + γ -L-Glu-NA 50 мкг/кг внутрибрюшинно; 5 группа - сенсibilизация + γ -L-Glu-NA 500 мкг/кг перорально.

Результаты обрабатывались статистически [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. В таблице 1 представлены данные изменения длительности ГС у мышей различных линий, гибридов BDF1 и морских свинок под влиянием γ -L-Glu-NA. Показано, что при введении соединения в дозах 50 мкг/кг и 500 мкг/кг длительность ГС снижалась у мышей линии CBA на 18% и 26% соответственно. У мышей BALB/c^h57 и BDF1 отмечалось уменьшение времени ГС только при введении соединения в дозе 500 мкг/кг на 43% и 15% соответственно. Введение соединения морским свинкам приводило к снижению времени ГС на 46%.

Таблица 1. Изменение длительности гексеналового сна (в минутах) у животных под влиянием γ -L-Glu-NA (количество животных в группе - 10)

Воздействие Животные	Контроль	γ -L-Glu-NA 50 мкг/кг	γ -L-Glu-NA 500 мкг/кг
BDF1	23,78±0,78	24,92±1,10	20,33±0,59*
CBA	21,88±1,34	17,98±1,66*	16,13±1,86**
BALB/c ^h 75	29,16±5,68	26,50±3,49	16,72±1,27***
Морские свинки	24,76±3,23	13,48±1,02*	-

Достоверность различий по отношению к контрольной группе. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что у морских свинок при введении γ -L-Glu-NA и ФБ достоверно повышалось в печени содержание как цитохрома P450 в 1,26 и 1,83 раза соответственно, так и цитохрома b_5 в 1,64 и 2 раза соответственно. При этом у животных обеих групп отмечалось достоверное увеличение количества цитохромов P450B в среднем на 72%, а у животных, получавших исследуемое соединение, - соотношения цитохромов P-450B к P-450L (в 2,3 раза) и соотношения цитохромов b_5 и P 450 (в 1,3 раза).

Результаты эксперимента по изучению изменения гормонального статуса под влиянием γ -L-Glu-NA у интактных и сенсibilизированных животных

представлены в таблице 3. Введение исследуемого соединения интактным животным приводило к достоверному повышению количества свободного кортизола (F, на 28%), его предшественников оксипрогестерона (17-ОН-Р, на 37%) и дезоксикортизола (на 49%), а также тироксина на 24%. У сенсibilизированных морских свинок выявлено достоверное уменьшение количества F, 17-ОН-Р и тироксина в сыворотке крови на 30%, 45% и 28% соответственно. У сенсibilизированных животных, которым вводили соединение в дозе 50 мкг/кг, отмечалась нормализация содержания всех исследованных гормонов в сыворотке крови. При введении сенсibilизированным животным γ -L-Glu-NA в дозе 500 мкг/кг наблюдалось повышение количества глюкокортикоидов в сыворотке крови до контрольных значений, однако содержание тироксина было достоверно ниже (на 28%).

Таблица 2. Изменение состояния системы цитохрома P450 печени под влиянием γ -L-Glu-NA (количество животных в группе - 10).

Показатели \ Группы животных	Контроль 1	Фенобарбитал 2	Соединение 3
Цитохром b_5 нмоль/мг белка	0,61 \pm 0,02	1,21 \pm 0,10*	1,00 \pm 0,03*
Цитохром P450 нмоль/мг белка	0,82 \pm 0,07	1,50 \pm 0,09*	1,03 \pm 0,03
Цитохромы P450B нмоль/мг белка	0,43 \pm 0,03	0,76 \pm 0,08*	0,72 \pm 0,02*
P-450B/P450L	1,10	1,02	2,32**
b_5 /P-450	0,82	0,81	0,97*

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - достоверность различий по отношению к контрольной группе.

Выявлено, что при пероральном введении γ -L-Glu-NA в дозах 20, 50 и 150 мкг/кг достоверно снижалась величина бронхоспазма на 43%, 70% и 36% соответственно. Введение соединения в дозе 50 мкг/кг внутрибрюшинно приводило к снижению величины бронхоспазма на 36%, что достоверно меньше, чем при использовании γ -L-Glu-NA перорально. Применение исследуемого соединения в дозах 5 и 500 мкг/кг не вызывало изменения тяжести проявлений реакции бронхоспазма. Интал уменьшал величину бронхоспазма на 50%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Ранее показано, что развитие экспериментальных аллергических реакций формируется на фоне снижения содержания терминальной оксигеназы и дестабилизированного состояния компонентов монооксигеназной системы печени, оцениваемого по обновляемости цитохромов b_5 и P450 [4]. Было показано, что изменение содержания и соотношения групп цитохромов P450B и P450L в печени коррелирует с изменением длительности гексеналового сна, гормонального статуса и тяжестью проявлений анафилактического шока у морских свинок. Активация ферментов системы цитохрома P450 индукторами типа фенобарбитала приводит к ослаблению тяжести проявлений экспериментальных аллергических реакций [13]. В то же время при введении сенсibilизированным животным метирапона, ингибитора системы цитохрома P450 и синтеза кортизола, отмечается усиление бронхоспазма [14,15]. Состояние сенсibilизации у людей и у экспериментальных

животных сопровождается снижением содержания глюкокортикоидов в крови и в моче. Нормализация количества гормонов коры надпочечников приводит к улучшению клинической картины заболевания у людей и снижению тяжести проявлений аллергической реакции у животных [16,17], а снижение их количества к их усилению [14,15].

Таблица 3. Изменение содержания гормонов в сыворотке крови под влиянием γ -L-Glu-NA (количество животных в группе – 12).

Группы животных Показатели	1 группа Соединение 50 мкг/кг	2 группа Сенсиби- лизация	3 группа Сенсиби- лизация + Соединение 50 мкг/кг, per os	4 группа Сенсиби- лизация + соединение 50 мкг/кг, в/б	5 группа енсибилизация + сое- динение 500 мкг/кг, per os
контроль кортизол	1474,5	3079,1	1910,3	1543,8	1344,4
опыт	1891,5*	2157,7*	1997,0	1462,	1541,0
контроль оксипрогестерон	2,83	2,95	1,79	3,12	3,27
опыт	3,88*	1,93*	2,31*	3,04	3,26
контроль дезоксикортизол	20,8	21,58	28,9	29,8	26,8
опыт	30,95*	20,91	33,5	27,7	29,6
контроль тироксин	11,7	22,56	18,88	18,93	13,51
опыт	14,5*	16,23**	15,71	15,83	9,73**

Количество гормонов в крови рассчитывали в нмоль/л. * - достоверность различий вычисляли по отношению к индивидуальному контролю. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

Таблица 4. Изменение величины бронхоспазма под влиянием γ -L-Glu-NA.

Группы животных	Количество Животных в группе	Бронхоспазм (% от максимального)
1 группа – контроль	21	87,5 \pm 10,7
2 группа – Интал, 5 мг/кг	14	40,7 \pm 3,4*
3 группа – соединение, 5 мкг/кг, per os	12	85,4 \pm 3,2
4 группа – соединение, 20 мкг/кг, per os	12	50,1 \pm 4,0*
5 группа – соединение, 50 мкг/кг, per os	12	26,9 \pm 6,4**
6 группа – соединение, 50 мкг/кг, в/б	15	55,6 \pm 3,4*
7 группа – соединение, 150 мкг/кг, per os	12	56,0 \pm 4,6*
8 группа – соединение, 500 мкг/кг, per os	12	76,0 \pm 8,2

* - достоверность различий по отношению к контрольной группе,

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

Как видно из приведенных результатов, при введении γ -L-Glu-NA повышается содержание цитохромов P-450 и v_5 и активность монооксигеназной системы печени. По ряду параметров изменения монооксигеназной системы печени сравнимы с изменениями при введении фенобарбитала: снижение длительности гексеналового сна, увеличение общего содержания цитохрома P-450 и группы цитохромов P-450B. Однако изменения системы цитохрома P-450 печени под влиянием исследуемого соединения имеют свои особенности - повышается соотношение цитохромов P-450B/P-450L и соотношение цитохрома v_5 к цитохрому P-450. Эти изменения монооксигеназной системы коррелируют с увеличением содержания глюкокортикоидных гормонов в сыворотке крови. Наиболее выраженное ослабление бронхоспазма у морских свинок и нормализации количества гормонов коры надпочечников и тироксина наблюдается только при введении γ -L-Glu-NA в дозе 50 мкг/кг перорально. Следует отметить, что введение γ -L-Glu-NA приводит к дозозависимому изменению тяжести проявлений ЭАР и зависит от способа применения исследуемого соединения.

Наблюдаемые изменения содержания глюкокортикоидов в крови экспериментальных животных могут быть прямым следствием индукции ферментов монооксигеназной системы надпочечников на различных этапах их синтеза. Так при введении γ -L-Glu-NA отмечается не только увеличение содержания основного метаболита биосинтеза глюкокортикоидов, но и его предшественников - 17-оксипрогестерона и 11-дезоксикортизола.

Представленные результаты свидетельствуют, что под влиянием γ -L-Glu-NA происходит структурная перестройка системы цитохрома P-450 печени, изменение гормонального статуса и повышение биологической устойчивости животных к сенсibiliзирующему воздействию.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 97-03-33158@. Биологические испытания осуществлены при технической и финансовой поддержке НПФ «Фарминтерпрайзес».

ЛИТЕРАТУРА.

1. Weinreich D. (1979), J. Neurochemistry, **32**, 363-369
2. Konishi H., Kakimoto Y. (1976), J. Neurochemistry, **27**, 1461-1463
3. Feuer L. (1983), Biología, **31**, 125-166
4. Omura T., Sato R. (1964), J.Chem, **239**, 2379-2385.
5. Andersson P. (1980), Allergy, **35**, 65-71.
6. Conzett H., Rossler R. (1940), Arch. Exp. Patol.Farmacol. **195**, 71-74.
7. Ahokas J., Pelkonen O., Karkin N. (1977), Cancer res, **37**, 3737-3743.
8. Изотов М.В., Щербаков В.М., Девиченский В.М. и др. Способ определения содержания изоферментов цитохрома P-450 в микросомах печени.// А.С. №1488738 -Б.И.-1989.-№3.-6.06.09, МКИ, 01.- №33/15, №33/48.
9. Hartree E. (1972), Ann. Biochem, **48**, 422-427.
10. Goncharov N.P., Kolesnikova G.S., Vorontsova V.I. et al.(1993) Proc. of the 5th Symp. on Analysis Steroids. 407-426.

11. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов., (1978), М, Наука, 365 с.
12. Кржечковская В.В., Мальцев Г.Ю., Марокко И.Н., (1983), 4-й Всесоюз. симп. по мед. энзимологии, с.137
13. Марокко И.Н., Кржечковская В.В., Маликова Н.А. и др. (1991) Бюлл. эксп. биол. мед., **8**, 200-202.
14. Fornhem C., Kumlin M., Lundberg J.M et al, (1995) Eur. Resp. J, **8**, 1100-1109.
15. Fornhem C., Lundberg J.M., Alving K, (1995), Eur. Resp. J., **8**, 928-937.
16. Марокко И.Н., Кржечковская В.В., Маликова Н.А. (1989) Матер. Всес. конф. "Цитохром Р-450 и модификация макромолекул", Ялта, 339.
17. Мачарадзе Д.Ш., Марокко И.Н., Балаболкин И.И. и др, (1994) Педиатрия, №3, 9-12.

Поступила 20.11.1997.

THE INFLUENCE OF γ -L-GLUTAMYLHISTAMINE ON THE SEVERITY OF EXPERIMENTAL ANAPHYLACTIC REACTION, HORMONAL STATION AND LIVER CYTOCHROME P-450.

NEBOLSIN V.E., KRZECCHKOVSKAYA V.V., ZHELTUKHINA G.A.,
EVSTIGNEEVA R.P., KOVALEVA V. L.

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow.

γ -L-Glutamylhistamine (γ -GluHA) was synthesized at Department of the chemistry and technology of fine organic compounds M. V. Lomonosov Moscow state academy of fine chemical technology. It was investigated the influence of γ -L-glutamylhistamine on the severity of experimental anaphylactic reaction, hormonal content in blood plasma and liver cytochrome P-450. The induction of liver cytochrome P-450, the elevation of hormonal content (thyroxine and glucocorticoids) in blood plasma and decrease of the severity of experimental anaphylactic reaction are observed.

Key words: γ -L-glutamylhistamine, experimental anaphylactic reaction, hormone, cytochrome P450, liver.