

УДК 577.152.1

©Коллектив авторов

ПОКАЗАТЕЛИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА-ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-КАТАЛАЗА ПОСЛЕ ЕГО ЛЕЧЕБНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ

А.В. Максименко, А.В. Ваваева, М.А. Звягинцева, А.А. Абрамов, А.А. Тимошин, А.В. Ваваев, В.Л. Лакомкин*

Институт экспериментальной кардиологии,
Российский кардиологический научно-производственный комплекс (РКНПК),
121552, Москва, 3я Черепковская ул. 15А; тел./факс: (499)-726-31-16; эл. почта: alexmak@cardio.ru

Ранее установлено, что биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза (СОД-ХС-КАТ) повышал выживаемость крыс с эндотоксическим шоком, вызванным введением липополисахарида (ЛПС). Этот эффект отмечен как при внутривенном превентивном (до ЛПС), так и лечебном (после ЛПС) введении конъюгата в организм. В данной работе показано, что при развитии эндотоксического шока у крыс в печени, лёгких, почках, сердце животных отмечался повышенный уровень содержания NO, который достоверно не изменялся после введения конъюгата СОД-ХС-КАТ. В то же время, изменение показателей содержания в крови мочевины и креатинина свидетельствует в пользу защитного действия конъюгата на функцию почек, а разнообразие изменений иных биохимических показателей затрудняло формирование согласованных заключений по состоянию других органов.

Ключевые слова: липополисахарид, окислительный стресс, эндотоксический шок, биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза, антиоксидантная энзимотерапия

DOI 10.18097/PBMC20166203295

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс, характеризующийся избыточным образованием активных форм кислорода (АФК), сопровождается развитием различных, в том числе и сердечно-сосудистых, патологий. Терапевтическая необходимость блокирования губительного действия окислительного стресса обусловила исследование и использование антиоксидантов. Среди них высокой эффективностью действия отличаются антиоксидантные ферменты. Для улучшения их фармакологического профиля нами был получен ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза (СОД) с каталазой (КАТ), связанных через гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса – хондроитинсульфат (ХС) [1]. Такой конъюгат СОД-ХС-КАТ проявлял свои антиоксидантные свойства при превентивном и профилактическом внутривенном введении [2]. На модели эндотоксического шока у крыс, вызванного введением им липополисахарида (ЛПС), выделенного из бактерий *Salmonella enterica serotype Typhimurium*, конъюгат СОД-ХС-КАТ проявлял защитное действие как после своего превентивного (до введения ЛПС), так и лечебного (после болюса ЛПС) введения [3]. Последнее свидетельствовало о многообразии (при использовании превентивного или лечебного режима введения) защитных эффектов биферментного конъюгата.

Целью настоящей работы было исследование возможных путей защиты органов крыс при эндотоксическом шоке и изучение природы наблюдаемых повреждений по биохимическим показателям крови (отобранной на шестой час после введения ЛПС) при лечебном применении биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ (вводимого на 20 минут позже болюса ЛПС).

МЕТОДИКА

Материалы

В работе были использованы препараты Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД), выделенной из бычьих эритроцитов, со специфической активностью 3000 Ед/мг белка; каталазы (КАТ) из печени быка со специфической активностью 11000 Ед/мг белка; хондроитинсульфат А (ХС, мол. масса 25-50 кДа) из трахеи быка; бензохинон и диметилформамид от фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ получали, используя ранее описанный метод [1]. Весовое содержание белка в препарате СОД-ХС-КАТ составляло 4-6%, удельная (специфическая) активность СОД – 60 Ед/мг препарата, КАТ – 140 Ед/мг препарата.

Список сокращений: АФК – активные формы кислорода; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ХС – хондроитинсульфат; СОД-ХС-КАТ – ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза; ЛПС – липополисахарид; АПФ – ангиотензин-превращающий фермент; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; iNOS – индуцибельная NO-синтаза, Fe-DETC – комплекс железа и диэтилдитиокарбамата.

* - адресат для переписки

Методы

Протокол работ с крысами соответствовал Правилам экспериментальных работ с животными; исследование, выполненное на 64 самцах крыс линии Sprague Dawley весом 323 ± 8 , согласовано с Этическим комитетом РКНПК.

Моделирование эндотоксического шока внутривенным введением липополисахарида

Под золотильным наркозом (50 мг/кг) крысам вживляли катетеры PE-50 в яремную вену, сонную артерию и выводили их на холку. Эндотоксический шок вызывали на следующий день у бодрствующих животных путём внутривенного введения ЛПС из бактерий *Salmonella enterica serotype Typhimurium* ("Sigma"), в дозе 15 мг/кг (группа животных с ЛПС) [3]. Конъюгат СОД-ХС-КАТ (3 мг/кг) внутривенно вводили через 20 минут после болюсного введения ЛПС (группа животных с ЛПС и СОД-ХС-КАТ).

Определение содержания NO в органах

Содержания NO в органах исследовали с помощью липофильной спиновой ловушки на основе комплексов ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC) с регистрацией образующихся спиновых аддуктов с помощью ЭПР-спектроскопии [4]. Компоненты этой ловушки (сернокислородное железо с цитратом натрия и диэтилдитиокарбамат) вводили за двадцать минут до забоя животных. Сернокислородное железо с цитратом натрия вводили подкожно в область лопатки, раствор диэтилдитиокарбамата вводили внутрибрюшинно. Животные забивались передозировкой уретана, вводимого внутривенно через 2, 4 или 6 ч после введения ЛПС. После забоя крыс осуществляли забор сердца, лёгких, печени, почек. Органы измельчали, помещали в пластиковую трубку и замораживали при температуре жидкого азота. Регистрацию их спектров ЭПР проводили при температуре жидкого азота. В разных опытах регистрацию уровня NO в органах осуществляли через 2, 4 и 6 ч после введения ЛПС. Конъюгат СОД-ХС-КАТ (3 мг/кг) вводили в лечебном режиме через 20 мин после введения ЛПС. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ЭПР X-диапазона (модель E-109E, "Varian", США) в области $g=2,03$. Исходя из спектров ЭПР образцов, определялась амплитуда сигнала спинового аддукта NO-Fe-DETC, которую далее нормировали на массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра. Схема экспериментов представлена на рисунке 1.

Отбор проб крови для биохимического анализа

Кровь для анализа забирали при установке катетера, а также на следующий день через 6 ч после введения ЛПС у бодрствующих животных. Кровь забирали через полиэтиленовый катетер PE-50 из сонной артерии животного в пластиковую пробирку в количестве от 1 мл до 1,5 мл без добавления гепарина или ЭДТА. Далее отобранную кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (центрифуга "Biosan LMC-3000"). Полученную сыворотку собирали в пластиковую пробирку и замораживали в жидком азоте. Биохимические исследования были выполнены на анализаторе Targa-2000 (Италия). Содержание мочевины определяли с помощью набора ЗАО "Диакон-ДС" (Россия), остальные параметры (общий белок, глюкоза, креатинин, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), общий билирубин, триглицериды, холестерин) определяли с помощью наборов фирмы "DiaSys" (Германия). Сыворотки сравнения Trulab N, Trulab P получены от фирмы "DiaSys". Для выяснения влияния наркоза на биохимические параметры крови группа из шести животных ($n=6$) без введения каких-либо веществ (группа без воздействий) была гильотинизирована с забором крови на исследование.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Сравнение двух групп проводили с применением двухстороннего критерия Стьюдента для оценки статистической значимости полученных различий ($p < 0,05$). Если групп сравнения было более двух, применяли метод ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение шести часов после введения ЛПС отмечен рост содержания спиновых аддуктов NO, характеризующий аналогичные изменения уровня оксида азота (включая его депонированные формы) в тканях исследуемых органов, причём через 4 часа его увеличение практически прекращалось (рис. 2). При этом максимальное увеличение уровня NO зарегистрировано в печени животного. В других органах увеличение уровня NO было менее выражено. Через четыре часа после введения ЛПС наблюдалась стабилизация уровней NO в органах (рис. 2). На рисунке 3 представлены результаты анализа

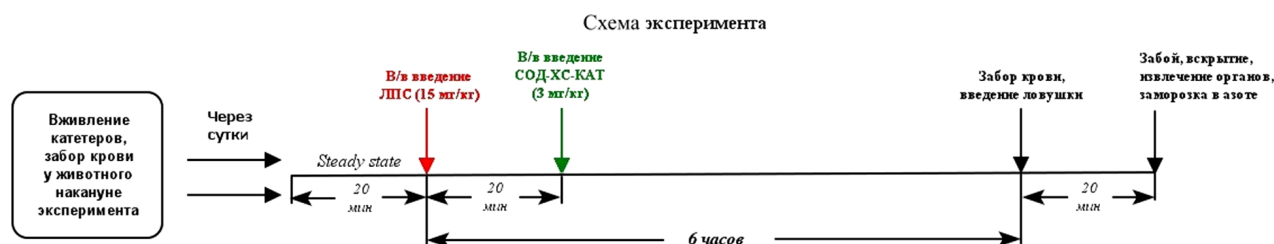


Рисунок 1. Схема проведения эксперимента.

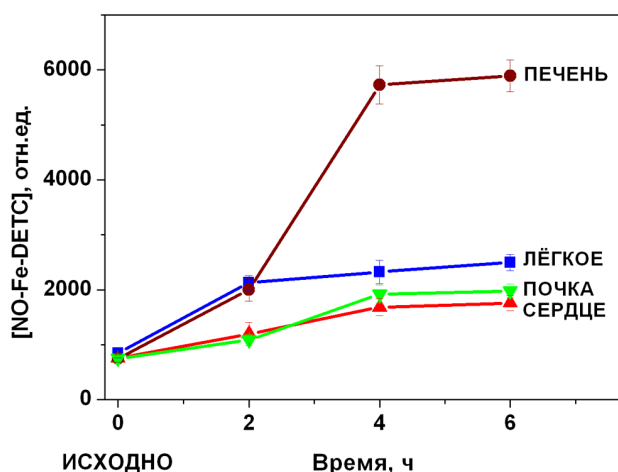


Рисунок 2. Накопление спинового аддукта NO-Fe-DETC в органах крыс в течение 2, 4 и 6 часов после введения ЛПС (от начального исходного уровня).

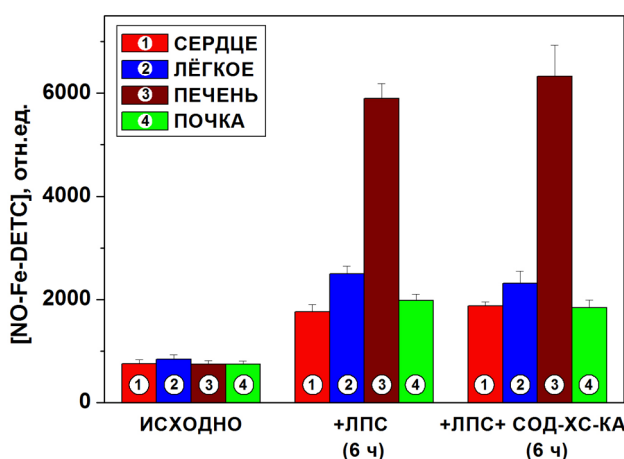


Рисунок 3. Содержание спинового аддукта NO-Fe-DETC в образцах ткани органов крыс в исходном состоянии (контроль) и через 6 часов после введения ЛПС или ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ.

уровня общего NO (свободного и связанного), соответствующие трём экспериментальным группам (исходное состояние / контроль /, введение ЛПС и ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ) на шестой час эксперимента. В этот момент времени в результате введения конъюгата СОД-ХС-КАТ никаких достоверных изменений уровня NO не наблюдалось при сравнении этих групп животных. Введение конъюгата СОД-ХС-КАТ не влияло на повышенный уровень NO в органах, вызванный введением ЛПС.

Таблица 1. Сравнение параметров указанных метаболитов, изменившихся под действием конъюгата СОД-ХС-КАТ (доза 3 мг/кг), по отношению к исходным

Показатель	Исходное состояние (наркоз)	Состояние через 6 часов после введения СОД-ХС-КАТ (бодрств. животные)
Щелочная фосфатаза, ед/л	945,9±43,1 (n=9)	537,3±13,37***↓ (n=6)
Холестерин, мМ	2,0±0,05 (n=8)	2,29±0,12*↑ (n=7)
Мочевина, мМ	5,92±0,22 (n=9)	3,99±0,22**↓ (n=7)
АСТ, ед/л	118,46±7,54 (n=8)	213,64±35,83***↑ (n=7)
Триглицериды, мМ	1,04±0,13 (n=9)	1,1±0,03***↑ (n=5)
Креатинин, мкМ	49,73±3,04 (n=9)	46,35±0,9↓ (n=7)

Примечание: n - количество использованных животных; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

По имеющимся данным [5, 6] одним из основных повреждающих факторов внутренних органов на начальном этапе поражения предстает пероксинитрит. Именно его разрушение повышало выживаемость при эндотоксическом шоке, а не блокады разных NO-синтаз [7]. Вместе с тем, снижение уровня пероксинитрита не является единственным направлением лечебного действия. На такой же модели эндотоксического шока у крыс (как в настоящей работе) конъюгат СОД-ХС-КАТ достоверно снижал показатель суточной летальности животных после введения ЛПС [3], демонстрируя отсутствие отличий уровня NO в группах крыс с ЛПС и ЛПС с СОД-ХС-КАТ (рис. 3). Вместе эти данные свидетельствовали о существовании других механизмов защитного действия производного СОД-ХС-КАТ (вероятно, реализуемых NO-независимым путём, возможно, супрессией генов ферментов, ответственных за продуцирование АФК, индукцией генов антиоксидантных биокатализаторов, супрессией воспалительных ответов) помимо предохранения NO от превращения в пероксинитрит. Появляется экспериментально обоснованный интерес и значимость последовательного изучения протекторных эффектов биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ [1-3].

Приведённые в таблице 1 биохимические параметры крови животных, которым вводили только конъюгат СОД-ХС-КАТ (доза 3 мг/кг) свидетельствуют об отсутствии заметного токсического действия конъюгата СОД-ХС-КАТ. Удовлетворительная переносимость животными (кролики, крысы) производного СОД-ХС-КАТ отмечалась ранее при его нормализующем действии на показатели гемодинамики в условиях модельного окислительного стресса [2].

В таблице 2 приведены биохимические показатели крови крыс, которым вводили только ЛПС. Повышение показателей мочевины на шестой час эксперимента (достоверное) и креатинина крови, а также снижение АЛТ, по-видимому, свидетельствует о снижении выводящей функции почек.

В условиях эндотоксического шока, вызванного введением ЛПС, конъюгат СОД-ХС-КАТ снижал активность щелочной фосфатазы, а также содержание холестерина, мочевины, креатинина в крови (а концентрацию мочевины – значимо, сравнение групп крыс с введением только ЛПС и ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ, табл. 2 и 3) на шестой час эксперимента. Это свидетельствует о защитном эффекте конъюгата на функцию почек (рис.4, А и Б).

ЭФФЕКТЫ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА ПРИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ

Таблица 2. Параметры, значимо изменившиеся под действием ЛПС через 6 часов после его введения (15 мг/кг), по сравнению с исходными

Показатель	Исходное состояние (наркоз)	Состояние через 6 часов после введения ЛПС (бодрств. животные)
Щелочная фосфатаза, ед/л	800,8±31,1 (n=25)	533,4±44,7***↓ (n=12)
Холестерин, мМ	1,7±0,04 (n=26)	2,4±0,13***↑ (n=12)
Мочевина, мМ	5,45±0,11 (n=24)	12,34±1,05***↑ (n=13)
Креатинин, мкМ	56,3±0,65 (n=23)	64±3,58↑ (n=10)
АСТ, ед/л	92,47±2,84 (n=23)	177,22±22,57***↑ (n=12)
Триглицериды, мМ	0,92±0,07 (n=25)	1,09±0,09↑ (n=11)
АЛТ, ед/л	73,41±3,3 (n=25)	49,76±4,67*↓ (n=12)
Билирубин, мМ	0,93±0,11 (n=22)	1,40±0,20↑ (n=13)

Примечание: n - количество использованных животных; * - показатель достоверности сравнения исходных параметров (после операции, без введений) с таковыми через 6 часов после введения ЛПС (LPS): * - p < 0,05; а также ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

Таблица 3. Биохимические показатели крови на шестой час после введения (конъюгата СОД-ХС-КАТ, ЛПС и конъюгата СОД-ХС-КАТ с ЛПС (для последнего сочетания данные приведены в % и концентрационном выражении)) в % к исходным параметрам (взяты за 100% показатель)

Показатель	Введение СОД-ХС-КАТ	Введение ЛПС	Введение СОД-ХС-КАТ и ЛПС (%) (конц. содерж.)
Щелочная фосфатаза	54,6±2,4 (n=7)	63,2±3,5 (n=12)	71,3±6,1@ (n=10) 424,8±16,86* (n=10), ед/л
Холестерин	113,2±5* (n=7)	136,7±6,8 (n=12)	135,5±8,3@ (n=10) 2,07±0,06* (n=9), мМ
Мочевина	70,3±6,8*** (n=7)	220,2±19,6 (n=13)	192,5±9,2*** (n=8) 9,71±0,36* (n=8), мМ
Креатинин	99,5±7,9 (n=7)	115,4±6,8 (n=10)	108,6±3,1 (n=7) 58,22±1,73*** (n=6), мкМ
АСТ	188,5±5,83 (n=7)	193±28,7 (n=11)	229±17 (n=10) 204,24±16,52 (n=10), ед/л
Триглицериды	84,7±1,7* (n=6)	130,7±17 (n=11)	184,5±19,2** (n=9) 1,65±0,26 (n=10), мМ
АЛТ	82,9±1@ (n=3)	73,2±10,5 (n=12)	120±10,9** (n=8) 57,31±6,12 (n=8), ед/л
ЛДГ	66,8±5* (n=5)	224,7±29,9 (n=11)	159,7±28,1@ (n=9) 333,9±43,71 (n=9), ед/л
Билирубин	80,4±13,8** (n=6)	171,3±19,4 (n=9)	120,1±20,9 (n=10) 3,12±0,28 (n=9), мМ

Примечание: n - количество использованных животных; @ - показатель достоверности сравнения действия конъюгата СОД-ХС-КАТ и конъюгата СОД-ХС-КАТ с ЛПС * - p < 0,05; а также ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

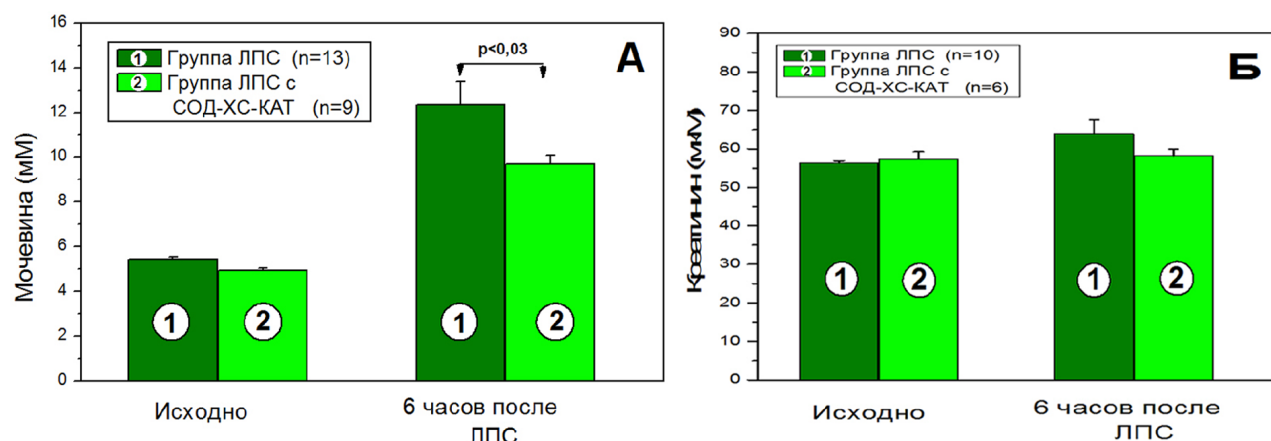


Рисунок 4. Влияние ЛПС и ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ на содержание мочевины (А) и креатинина (Б) в плазме крови крыс через 6 часов после введения ЛПС.

Влияние конъюгата СОД-ХС-КАТ на параметры, отражающие функцию печени неоднозначно. Из четырёх показателей (щелочная фосфатаза, АСТ, АЛТ, билирубин), по которым принято оценивать состояние печени, два основных фермента – АСТ и АЛТ изменялись недостоверно и разнонаправленно в сравнении показателей контрольной группы без воздействий к группе с воздействием ЛПС (табл. 2). При сравнении

групп крыс, получавших ЛПС с группой крыс, получавших ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ (табл. 2 и 3, рис. 5А), показатели АСТ увеличивались. Исходные значения АЛТ в группе крыс с ЛПС и в группе крыс с введением ЛПС и конъюгата СОД-ХС-КАТ достоверно различались между собой начально (рис. 5Б), в то время как на 6-й час эксперимента они не различались вовсе. Два других параметра изменялись достоверно, но тоже

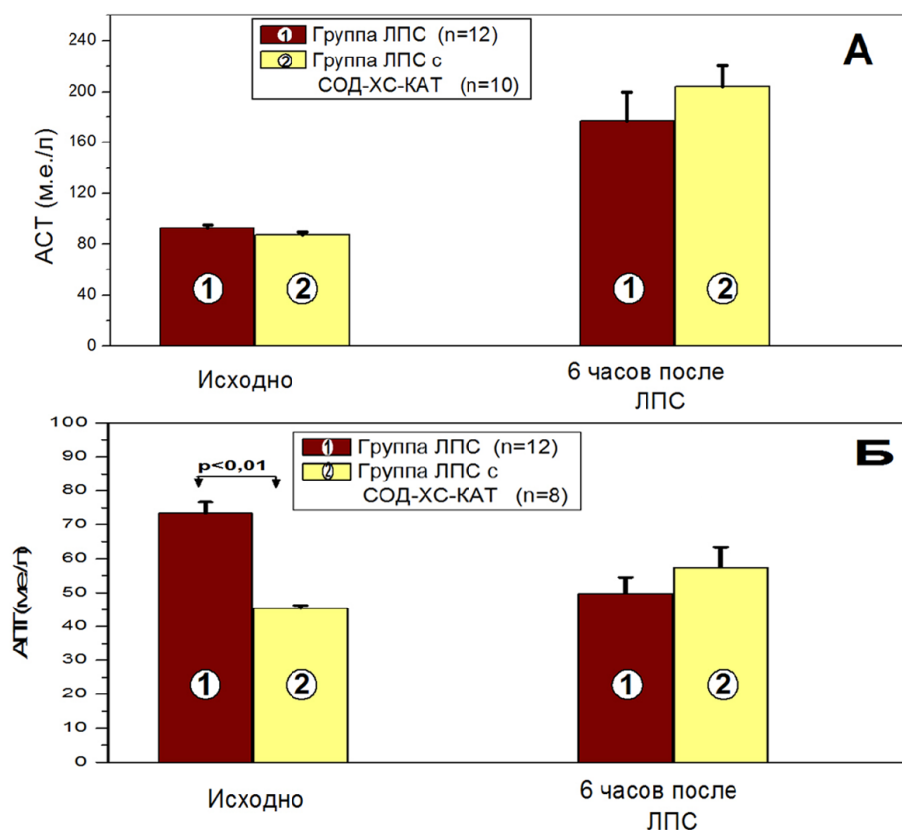


Рисунок 5. Влияние ЛПС и ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ на активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) (А) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) (Б) в плазме крови крыс через 6 часов после введения ЛПС.

разнонаправленно: щелочная фосфатаза падала с исходных $800,8 \pm 31,1$ ед/л в группе наркоза (или $737,42 \pm 36,18$ ед/л в группе без воздействий) до $533,4 \pm 44,7$ ед/л в группе, получавшей ЛПС (табл. 2), и до $424,8 \pm 16,86$ ед/л в группе, получавшей ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ (табл. 3). В то же время, уровень общего билирубина крови менялся в этих же группах разнонаправленно (табл. 2, 3).

При введении животным только конъюгата СОД-ХС-КАТ концентрация креатинина и мочевины снижались, снижалась и активность щелочной фосфатазы (табл. 1). Это свидетельствовало о благоприятном воздействии на почки. Холестерин и триглицериды поднимались незначительно, а вот подъём АСТ был более существенным (табл. 1), хотя по данным литературы этот показатель у грызунов менее стабилен и информативен, чем АЛТ [8].

По данным литературы, на шестой час после введения ЛПС сильно повышались многие показатели (мочевина [6, 8-13], креатинин [6, 11-13], АЛТ и АСТ [6, 7, 11-15], билирубин [6, 7, 13, 14], щелочная фосфатаза [7], холестерин и триглицериды [11, 12], липаза и амилаза [7]), что свидетельствует о полиорганной патологии. В наших экспериментах активность щелочной фосфатазы и АЛТ снижались (табл. 2). Возможно, это связано с влиянием наркоза, так как при переходе от наркоза к бодрствованию активность щелочной фосфатазы также снижалась. При эндотоксическом поражении наблюдалось повреждение печени, почек, поджелудочной железы [7].

Достоверные различия в исходном уровне билирубина крови и через шесть часов после введения ЛПС в контрольной группе или в группе, получавшей ЛПС с конъюгатом СОД-ХС-КАТ полностью укладываются (табл. 2 и 3) в границы нормы (до 10 мМ) [10].

Введение конъюгата СОД-ХС-КАТ на фоне ЛПС существенно снижало уровни мочевины и креатинина крови (табл. 2 и 3), что свидетельствует о благоприятном действии препарата на почки при эндотоксическом шоке. Но на показатели работы печени эффект не был однозначным, так как уровни АЛТ и триглицеридов поднимались существенно, особенно в % к исходным ($120 \pm 10,9\%$ и $184,5 \pm 19,2\%$, соответственно, табл. 3), в то же время концентрация холестерина и активность щелочной фосфатазы (в ед/л и мМ) падали (табл. 2 и 3). Таким образом, конъюгат СОД-ХС-КАТ не проявлял однозначного защитного эффекта на функцию печени.

Полиорганная патология, развитие которой вызвано внутривенным болюсным введением крысам ЛПС, сопровождается многочисленными (порой разнонаправленными) изменениями биохимических показателей крови (табл. 2 и 3). Возмущающее действие ЛПС смягчается введением на его фоне конъюгата СОД-ХС-КАТ (снижение показателей мочевины и креатинина, таблицы 2 и 3, рисунок 4), подтверждая защитный эффект биферментного производного (табл. 1) на функцию почек (табл. 3, рис. 2). Многообразные изменения

в этих условиях показателей АСТ, триглицеридов (у обоих увеличение), холестерина, щелочной фосфатазы (у обоих уменьшение) затрудняли оценку влияния конъюгата на функцию печени (табл. 2 и 3). Вероятно, определение маркерных биохимических признаков состояния печени при эндотоксическом шоке требует отдельного изучения.

Следует отметить, что наркоз сам по себе оказывал существенное влияние на биохимические параметры крови: концентрация глюкозы возросла более чем в 2 раза, повышение креатинина и триглицеридов было не столь выраженным, а вот показатели АСТ и ЛДГ существенно снижались (табл. 4). Показатель активности ЛДГ оказался весьма неспецифическим параметром, который повышался при любом повреждении клеток, что часто происходит при любом воспалении. Даже исходно в группах он сильно различался. Например, у бодрствующих и наркотизированных контрольных животных его концентрация в крови различалась более, чем в 3,5 раза (табл. 4). При таких исходных различиях достоверно улавливать его изменения при развитии эндотоксического шока весьма затруднительно.

Таблица 4. Сопоставление параметров сыворотки, достоверно изменившихся под действием наркоза

Показатель	Без наркоза (n=6)	Под наркозом (n=52)
АСТ, ед/л	209,5±19,5	95,6±2,4***↓
ЛДГ, ед/л	1158,8±109,35	293,8±24,5***↓
Глюкоза, мМ	6,98±0,44	15,1±0,58***↑
Триглицериды, мМ	0,77±0,7	0,95±0,05*↑
Креатинин, мкМ	42,9±2,14	56,23±0,89**↑

Примечание: n - количество использованных животных; * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутривенное введение биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ при инициации ЛПС развития эндогенного шока у крыс приводило к достоверному увеличению (в 1,4 раза) выживаемости животных как при превентивном (введение конъюгата до ЛПС), так и лечебном (введение конъюгата после ЛПС) применении этого производного [3]. Эти данные наглядно указывали, что лечебная эффективность конъюгата СОД-ХС-КАТ обусловлена не только его прямым антиоксидантным действием (особенно в начальный период развития поражения) [2], но и другими опосредованными и отдаленными терапевтическими эффектами. Развитие индуцированного ЛПС эндотоксического шока характеризовалось повышенным уровнем NO в печени, лёгких, почках, сердце крыс. Введение конъюгата СОД-ХС-КАТ в лечебном режиме достоверно не меняло эти показатели, а, судя по изменению содержания в крови мочевины и креатинина, оказывало защитное действие на функцию почек. По литературным данным отмечалось возможное влияние экзогенной СОД на эндогенные защитные антиоксидантные системы [16], NO-независимый путь

стимуляции гуанилилциклазы, способствующий снижению размера инфаркта миокарда у крыс [17], появление АФК на поздних стадиях развития ангиотензин-II – индуцированной гипертензии [18]. Было обнаружено, что имеется влияние NO на базальный уровень ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в статичных условиях, но нет такой связи с супрессией гена АПФ, вызванной напряжением сдвига (shear stress) [19]. АПФ оказывается механосенсором регуляции своей активности в ответ на напряжение сдвига [20, 21]. Эти данные указывают на NO-независимые пути проявления вазодилатации/констрикции, обосновывают актуальность выяснения механизма действия антиоксидантных ферментов, что определяет направления развития антиоксидантной терапии, приемов и средств её осуществления.

Разнообразие изменений исследованных в настоящей работе биохимических показателей крови затрудняют формирование согласованных однозначных заключений в отношении состояния других органов. Полученные результаты вместе с данными ускоренной нормализации артериального давления и частоты сердечных сокращений, достоверного снижения уровня летальности [2, 3] при использовании биферментного конъюгата указывают на важность изучения механизма его действия на моделях сердечно-сосудистых поражений, связанных с участием других вазоактивных агентов помимо NO [22, 23].

Авторы признательны за сотрудничество в проведенной работе сотрудникам ФГБУ "РКНПК" Минздрава России профессору Е.В. Арзамасцеву, В.П. Полуэктовой и Л.В. Габовой.

Настоящее исследование было выполнено при частичной финансовой поддержке грантами РФФИ 15-04-03584 и 12-04-00015, а также Министерством здравоохранения Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- Максименко А.В., Тищенко Е.Г. (1997) Биохимия, **62**(10), 1364-1368.
- Максименко А.В., Ваваев А.В., Бурячковская Л.И., Мох В.П., Учитель И.А., Лакомкин В.П., Капелько В.И., Тищенко Е.Г. (2010) Acta Naturae, **2**(4), 90-103.
- Максименко А.В., Ваваева А.В., Абрамов А.А., Ваваев А.В., Лакомкин В.П. (2014) Технологии живых систем, **11**(2), 35-44.
- Тимошин А.А., Лакомкин В.П., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. (2012) Биофизика, **57**(2), 331-337.
- Tunctan B., Sari A.N., Kacan M., Unsal D., Buharalioglu C.K., Sahar-Firat S., Korkmaz B., Falck J.R., Malik K.U. (2013) Prostaglandins Other Lipid Mediat., 93-108.
- Thiemermann C., Ruetten H., Wu C.-C., Vane J.R. (1995) British J. Pharmacol., **116**, 2845-2851.
- Cuzzocrea S., Mazzon E., Di Paola R., Esposito E., Macarthur H., Matuschak G.M., Salvemini D. (2006) J. Pharm. Experim. Ther., **319**, 73-81.
- Abraham E., Singer M. (2007) Crit. Care Med., **35**, 2408-2416.

9. Kar S., Kavdia M. (2013) *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 161-174.
10. Sharp P.E., La Regina M.C. (1998) in: *Laboratory Rats* (Editor-in-Chief Mark A. Suckow) CRC Press, Boca Ramos, Boston, London, New York, Washington, D.C.
11. Chen C.-H., Leeb R.-P., Wuc W.-T., Liaoh K.-W., Hsub N., Hsud B.-G. (2007) *Resuscitation*, **74**, 166-174.
12. Crespo E., Maci'as M., Pozo D., Escames G., Martin M., Vives F., Guerrero J.M., A-Castroviejo D.A. (1999) *FASEB J.*, **13**, 1537-1546.
13. Ruetten H., Southan G.J., Abate A., Thiernemann C. (1996) *British J. Pharmacol.*, **118**, 261-270.
14. Shi D.-W., Zhang J., Jiang H.-N., Tong C.-Y., Gu G.-R., Ji Y., Summah H., Qu J.-M. (2011) *Inflamm. Res.*, **60**, 841-849.
15. Lowes D.A., Webster N.R., Murphy M.P., Galley H.F. (2013) *British J. Anaesthesia*, **110**(3), 472-480.
16. Carrillon J., Rouanet J.M., Cristol J.P., Brion R. (2013) *Pharm. Res.*, **30**(11), 2718-2728.
17. Bice J.S., Keim Y., Stasch J.-P., Baxter G.F. (2014) *Cardiovasc. Res.*, **101**, 220-228.
18. Kimura S., Zhang G.-X., Abe Y. (2004) *J. Pharmacol. Sci.*, **96**, 406-410.
19. Petrini C.M., Miyakawa A.A., Laurindo F.R., Krieger J.E. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36**(9), 1175-1178.
20. Barauna V.G., Campos L.C.G., Miyakawa A.A., Krieger J.E. (2011) *PLoS One*, **6**(8), e22803.
21. Fleming I., Kohlstedt K., Busse R. (2005) *Physiology* (Bethesda), **20**, 91-95.
22. Максименко А.В., Турашев А.Д. (2014) *Биоорган. химия*, **40**(3), 259-274.
23. Nonaka R., Iesaki T., de Vega S., Daida H., Okada T., Sasaki T., Arikawa-Hirasawa E. (2015) *Physiol. Rep.*, **3** (e12272). DOI: 10.14814/phy2.12272.

Поступила: 30. 12. 2015.
Принята к печати: 23. 05. 2016.

PROTECTIVE ACTION FIGURATIONS FOR SUPEROXIDE DISMUTASE - CHONDROITIN SULFATE - CATALASE BIENZYME CONJUGATE AFTER ITS MEDICATIVE ADMINISTRATION IN ENDOTOXIN SHOCK

A.V. Maksimenko, A.V. Vavaeva, M.A. Zvyagintseva, A.A. Abramov, A.A. Timoshin, A.V. Vavaev, V.L. Lakomkin

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research-and-Production Complex,
15A 3-rd Cherepkovskaya str., 121552 Moscow, Russia; tel./fax: +7-499-726-31-16; e-mail: alexmak@cardio.ru

Previously it found that the bienzymatic conjugate superoxide dismutase-chondroitin sulfate, catalase (SOD-CHS-CAT) increased the survival rate of rats with endotoxic shock caused by the administration of lipopolysaccharide (LPS). This effect was observed both in preventive (before LPS) and therapeutic conjugate administration (after the administration of LPS). This study shows that the development of endotoxic shock is accompanied by increased levels of NO in the liver, lungs, kidneys, heart; administration of the SOD-CHS-CAT conjugate insignificantly influenced this parameter. At the same time, the changes in blood urea and creatinine suggest the protective effect of the conjugate on renal function, while diverse changes in biochemical parameters studied complicate the formation of the agreed conclusions on the state of other organs.

Key words: oxidative stress, endotoxin shock, bienzyme superoxide dismutase-chondroitin sulphate-catalase conjugate, antioxidant enzyme therapy