
ВЛИЯНИЕ ОПИОИДОВ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И СФИНГОЗИНОВЫЙ ПУТЬ АКТИВАЦИИ АПОПТОЗА В ПОЧКАХ

Ю.А. Белоус

Кафедра психотерапии и наркологии ФПКМР
Российский университет дружбы народов
Ул. Миклухо-Маклая, 21, корп.3, Москва, Россия, 117198
970-38-87

И.А. Комаревцева, Е.В. Комаревцева

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

Целью данного исследования является изучение влияния опиоидов на окислительный стресс и сфингозиновый путь активации апоптоза в почках.

Одним из подходов к повышению активности системы эндогенных антиоксидантов может быть активация опиоидной системы.

Эксперименты проводили на белых крысах 16—18-ти недельного возраста. У животных вызывали ОПН путем пережатия почечной ножки в течение 30 минут. После забоя крыс проводили забор почечной ткани для определения содержания сфингомиелина, сфингозина, активности СОД, уровня фрагментированной ДНК. Даларгин вводили внутривентриально в дозе 100 мкг/кг за 20 минут до формирования ОПН.

Полученные нами данные показывают, что, помимо непосредственно антиоксидантного действия при окислительном стрессе, даларгин, возможно, играет определенную роль в ингибировании метаболитов сфингомиелинового цикла и, соответственно, влиянии на апоптотическую гибель клеток.

Ключевые слова: даларгин, сфингозин, опиоиды, фрагментированная ДНК.

Многочисленные литературные данные указывают, что окислительный стресс может индуцировать апоптоз, в то время как антиоксиданты подавляют его. Одним из важнейших компонентов антиоксидантной системы является супероксиддисмутаза (СОД).

Синтетические антиоксиданты способны эффективно предупреждать повреждения, возникающие при экспериментальной ишемии и реперфузии тканей, но многие антиоксиданты оказывают цитопротекторный эффект только при использовании в очень больших дозировках. Например, ионол проявляет защитный эффект в дозе 50 мг/кг.

На наш взгляд, одним из подходов к повышению активности системы эндогенных антиоксидантов может быть активация опиоидной системы. Широкая распространенность и многообразие функций опиоидов позволили отнести их к классу регуляторных пептидов. В настоящее время на основе эндогенных пептидов интенсивно разрабатываются новые лечебные средства, применение которых позволяет влиять на течение заболеваний.

Так, спектр действия синтетического лей-энкефалина — даларгина — довольно широкий и отражает функции регуляторных пептидов, направленные на поддержание гомеостаза [2]. Препарат обладает гипотензивными, антистрессовыми,

антиишемическими, антигипоксическими и другими действиями. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о снижении даларгином летальности экспериментальных животных при почечных патологиях и является основанием рекомендовать его для лечения ОПН в условиях травматического шока [3]. Можно предположить, что определенное воздействие, связанное с его антиоксидантными свойствами, даларгин будет оказывать и на апоптоз.

Генератором вторичных посредников, участвующих в регуляции апоптоза, является сфингомиелиновый цикл, основные компоненты которого — это сфингомиелин, церамид, сфингозин и ферменты сфингомиелиназа и церамидаза. Окислительный стресс, вызванный опосредованными воздействиями (цитокинами, ишемией — реперфузией) [14], способствует активации сфингомиелинового цикла. Механизм этой активации до сих пор не изучен полностью, однако в настоящее время в литературе появились сведения о зависимости активности сфингомиелиназы от уровня окислительных процессов в клетке.

Имеются литературные данные [10], демонстрирующие изменение содержания сфингомиелина, церамида и сфингозина в индукционной фазе ОПН. При этом показано, что ишемия вызывает повышение уровня сфингозина и церамида приблизительно на 50% и предполагается важное значение их уровня в индукционной фазе и развитии постишемической ОПН.

И хотя известно, что антиоксиданты, выступая в качестве ловушек активных форм кислорода, подавляют апоптоз, однако зависимость активности сфингомиелиназы от уровня окислительных процессов может быть значительно более сложная. Данные о влиянии опиоидов на уровень продуктов сфингомиелинового цикла в экспериментах *in vivo* вообще отсутствуют. Связь между уровнем сфингозина и активностью СОД в почках *in vivo* в литературе нами также не обнаружена.

Целью работы явилось определение характера влияния даларгина на содержание сфингозина в почках, исследование связи между уровнем сфингозина и активностью СОД, а также изучение влияния даларгина на апоптоз, индуцированный ишемией — реперфузией в почках.

Методы исследования. Эксперименты проводили на белых крысах 16—18-недельного возраста. У животных вызывали острую почечную недостаточность (ОПН) путем двухстороннего пережатия почечной ножки в течение 30 минут. Животных забивали декапитацией после 30-минутной ишемии (контроль 2), а также на 1-е, 2-е и 3-и сутки. Затем проводили забор почечной ткани для определения содержания сфингомиелина, сфингозина, активности СОД, уровня фрагментированной ДНК.

Апоптоз, индуцированный ишемией — реперфузией, изучали морфологически с проведением гистологического исследования с окрашиванием депарафинированных срезов почечной ткани (Sigma) по Хехсту 33342 и по фрагментации ДНК клеток почек с использованием лизис-буфера и дифениламиновой детекции [6].

Даларгин (D-Ala-Leu-Arg⁶-enkephalin, Россия) вводили внутривенно в дозе 100 мкг/кг за 20 минут до формирования ОПН. Контрольным животным вводили физиологический контроль.

Содержание сфингомиелина определяли поэтапно. Общую липидную фракцию из почечной ткани извлекали по методу Фолча. Фосфолипидная фракция выделялась методом осаждения ацетоном [5]. Сфингомиелины извлекали методом тонкослойной хроматографии. Количество сфингомиелина оценивали по содержанию неорганического фосфата по методу Чена, используя хромогенный реагент [4]. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 700 нм. Содержание неорганического фосфата определяли по калибровочной кривой стандартного раствора $\text{KН}_2\text{PО}_4$. Концентрацию сфингомиелина выражали в пересчете на 1 мг белка.

Количественное определение белка проводили при помощи биуретовой реакции.

Для определения свободных сфингоидных оснований в цитозольной фракции гомогената нами был модифицирован метод, описанный М.И. Прохоровой [7]. Вначале проводилась щелочная экстракция сфингоидных оснований диэтиловым эфиром. Количественное определение сфингозина проводили по методу Лаутера—Трамса. Концентрацию сфингозина определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор сфингозина (Ammersham).

Активность СОД оценивали по способности фермента ингибировать накопление продукта аутоокисления адреналина в щелочной среде ($\text{pH} = 10,65$), поглощающего при 347 нм [9]. Методом дифференциального центрифугирования выделяли митохондриальную фракцию. О величине активности СОД в гомогенате судили по степени ингибирования или активации скорости аутоокисления адреналина (% ингибирования или ед. активности).

Статистическая обработка экспериментальных данных была проведена с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Довольно широко представлены эксперименты с раскрытием молекулярных причин развития ОПН [10]. Так, характерной особенностью ишемического почечного повреждения является частичный гидролиз мембранных фосфолипидов, сопровождающийся накоплением побочных продуктов. Один из них, арахидоновая кислота, может активировать сфингомиелиназу. Так, наиболее вероятным механизмом накопления сфингозина является ферментативный гидролиз церамида и сфингомиелина. Имеются интересные данные [1], указывающие, что в момент накопления сфингозина в ядрах наблюдается понижение содержания сфингомиелина и церамидов, которые могут быть источниками сфингозина.

В связи с этим для определения наличия или отсутствия взаимосвязи активности СОД и уровня сфингозина проводили исследования содержания сфингомиелина в почках.

В табл. 1 представлено изменение содержания сфингомиелина и сфингозина в клетках почек. Установлено, что в ходе эксперимента содержание сфингомиелина уменьшалось по сравнению с контролем. Так, уже через 30 минут отмечено снижение в 1,8 раза, на 1-е сутки — в 1,4 раза, на 2-е сутки — в 2,3 раза, на 3-и сутки — в 1,4 раза.

**Изменение содержания сфингомиелина, сфингозина и активности СОД
в почках при экспериментальной ОПН**

Период наблюдений	До введения даларгина		
	сфингомиелин, мкг/мг белка	сфингозин, нг/мг белка	СОД, % ингиб.
Контроль I, $n = 10$	$7,1 \pm 0,3$	$20,4 \pm 1,2$	$33,9 \pm 0,8$
Контроль II, $n = 6$	$4,8 \pm 0,5^*$	$46,3 \pm 3,6^*$	$21,3 \pm 0,8^*$
1-е сутки ОПН, $n = 6$	$5,3 \pm 0,6^*$	$34,2 \pm 3,7^*$	$12,5 \pm 1,8^*$
2-е сутки ОПН, $n = 6$	$3,6 \pm 0,4^*$	$62,2 \pm 8,5^*$	$7,5 \pm 1,1^*$
3-и сутки ОПН, $n = 6$	$5,7 \pm 0,6^*$	$36,6 \pm 3,5^*$	$14,8 \pm 1,0^*$
После введения даларгина			
Контроль II, $n = 6$	—	$25,3 \pm 1,8^{**}$	$22,1 \pm 1,4$
1-е сутки ОПН, $n = 6$	—	$22,1 \pm 1,3^{**}$	$23,4 \pm 1,2^{**}$
2-е сутки ОПН, $n = 6$	—	$26,2 \pm 3,7^{**}$	$17,31 \pm 1,3^{**}$
3-и сутки ОПН, $n = 6$	—	$24,2 \pm 2,8^{**}$	$26,3 \pm 1,6^{**}$

Примечание: * — достоверные различия с показателями контроля, $p < 0,05$. ** — достоверные различия с показателями групп ОПН, $p < 0,05$.

При этом установлено, что в экспериментальных группах уровень сфингозина повышался с максимальным показателем на 2-е сутки развития ОПН. Следовательно, противоположная динамика содержания сфингомиелина и сфингозина в клетках почек в группах ОПН свидетельствует об активации сфингомиелиназы и накоплении продуктов сфингомиелинового цикла. Так как наблюдаемое увеличение содержания сфингозина в клетках в ответ на ишемию — реперфузию происходит в результате ферментативного расщепления церамида, а не за счет синтеза *de novo*, то источником активного церамида является только сфингомиелин, другие сфинголипиды при гидролизе генерируют церамиды, из которых не наблюдается появление сфингозина. Известно, что в процессах пролиферации и апоптоза наиболее значимыми являются две изоформы фермента — кислая сфингомиелиназа (локализована в лизосомах) и нейтральная (локализована в плазматической мембране). Поскольку сфингозин мы определяли в цитозольной фракции, то, вероятно, наблюдалась активность именно этой изоформы фермента.

Одновременно в почках происходило изменение активности СОД после развития ОПН в сторону снижения по сравнению с контрольной группой. Минимальная активность антиоксидантного фермента наблюдалась на 2-е сутки, что совпадает с максимумом накопления сфингозина.

Введение даларгина вызывало достоверное снижение содержания сфингозина в почках по сравнению с группами чистой ОПН и достигало контрольных значений (рис. 1). В полном соответствии с антиоксидантными свойствами даларгина у подопытных животных по сравнению с группами чистой ОПН резко повышалась активность СОД. Так, на 1-е сутки прослеживалось увеличение активации в 1,9 раза, на 2-е сутки — в 2,3 раза, на 3-и сутки — в 1,8 раза (рис. 2). В группе 30-минутной постишемии не наблюдалось достоверных изменений активности СОД, что можно объяснить реализацией эффекта опиоида не через рецепторный механизм.

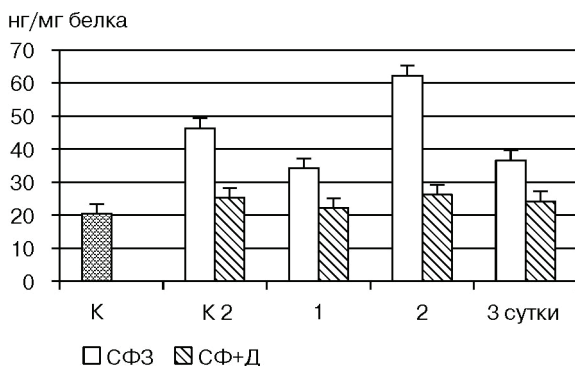


Рис. 1. Влияние даларгина на содержание сфингозина в клетках почек

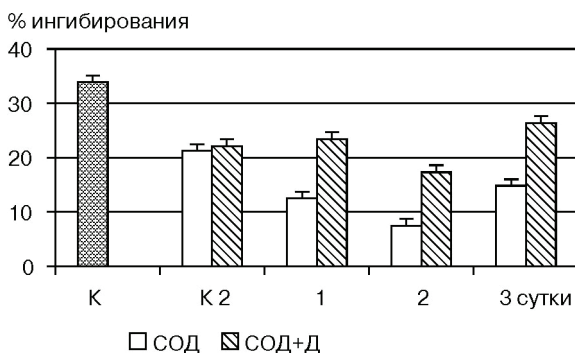


Рис. 2. Влияние даларгина на активность СОД в почках при экспериментальной ОПН

Имеются данные, что синтетический опиоид ингибирует свободнорадикальные процессы, очевидно, благодаря наличию в его структуре аргинина и тирозина, которые имеют антиоксидантные свойства [5]. Также механизм действия даларгина можно связать с активацией некоторых регуляторных систем, например, системой оксида азота.

В настоящее время нами ведутся исследования в этом направлении, которые доказывают, что синтетический лей-энкефалин способен активировать NO-синтазу в почках при ишемии — реперфузии. Аналогичные данные, но при нарушении миокарда, опубликованы в работе Т.Ю. Реброва и др. [8].

В наших исследованиях с предварительным введением даларгина характер изменения содержания сфингозина и активности СОД в почках был противоположным (табл. 1).

В табл. 2 продемонстрирована взаимосвязь между этими параметрами с достаточно высокими коэффициентами линейной корреляции.

Таблица 2

Матрица достоверных корреляционных связей между содержанием сфингозина, активностью СОД и фрагментацией ДНК в клетках почек при ишемии-реперфузии на фоне введения даларгина

Типы корреляционных связей	Коэффициент корреляции, r_{xy}	Вероятность корреляционных связей
Сфингозин — супероксиддисмутаза	-0,65	< 0,05
Сфингозин — фрагм. ДНК	+0,86	< 0,01
Супероксиддисмутаза — фрагм. ДНК	-0,95	< 0,001

Следует отметить, однако, что сама по себе выявленная закономерность необходима, но недостаточна для вывода о том, что состояние сфингомиелинового цикла зависит от состояния антиоксидантной системы в клетке. Несмотря на большой интерес к изучению основных компонентов этого цикла и к процессам влияния различных факторов на их активность, лишь в последние годы установлено, что активность сфингомиелиназы связана с окислительной системой клетки. В исследованиях, выполненных на клеточном уровне, было показано ингибирующее действие глутатиона на нейтральную сфингомиелиназу. Продемонстрировано, что синтетический антиоксидант ионол и СОД предотвращают апоптоз, вызванный активацией сфингомиелиназы липопротеинами низкой плотности. Поскольку наша модель ОПН сопровождается развитием окислительного стресса (ОС), то можно предположить, что даларгин может влиять на активность сфингомиелинового цикла (уровень сфингозина) путем уменьшения количества активных форм кислорода, а также изменения физико-химических свойств мембраны. Поэтому необходимо продолжить изучение связи между окислительным стрессом и активностью сфингомиелинового сигнального пути.

В настоящее время роль окислительного стресса в апоптозе является общепризнанной, активные формы кислорода могут не только запускать этот процесс, но и генерироваться при протекании апоптоза, индуцированного иными, неокислительными стимулами. Антиоксиданты, защищающие клетки от ОС, эффективно подавляют апоптоз. Уровень сфингозина, играющего проапоптотическую роль при экспериментальной ОПН, под действием даларгина, как показано выше (см. рис. 1), в клетках почек снижается. Можно предположить, что данный опиоид, являясь антиоксидантом и подавляя активность сфингомиелинового цикла, будет также оказывать влияние и на апоптоз.

Морфологические исследования подтвердили наличие апоптотических изменений ядер в срезах почечной ткани при экспериментальной ОПН: конденсация ядерного хроматина и его расположение по периферии ядра в виде полуколец, уменьшение размеров ядер и фрагментации ядер. Данные о фрагментации ДНК, полученные дифениламиновым тестом, представлены на рис. 3. Видно, что введение даларгина ингибировало деградацию ДНК в экспериментальных группах, кроме второй контрольной группы, по сравнению с группами чистой ОПН.

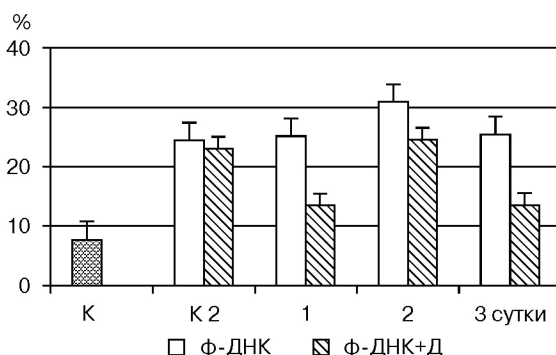


Рис. 3. Влияние даларгина на степень деградации ДНК в клетках почек при ишемии-реперфузии

По-видимому, ярко выраженное антиапоптотическое действие даларгина может быть обусловлено как непосредственно его антиоксидантными свойствами, так и его влиянием на уровень сфингозина. В табл. 2 продемонстрирована взаимосвязь между активностью СОД и фрагментацией ДНК ($r = -0,95$). Полученные нами результаты находятся в соответствии с литературными данными о прооксидантном действии сфингозина и с данными о защитном действии даларгина при ишемии — реперфузии.

В литературе имеются многочисленные подтверждения защитной роли антиоксидантов в процессах апоптоза, в то же время данные о том, что даларгин может защищать клетки от программируемой гибели, нами обнаружены не были. Показанное нами ингибирование даларгином апоптотической деградации ДНК, вызванной ишемией — реперфузией, может быть полезным для разработки тактики лечения ОПН.

Выводы. Таким образом, полученные нами данные показывают, что помимо непосредственно антиоксидантного действия при окислительном стрессе даларгин, возможно, играет определенную роль в ингибировании метаболитов сфингомиелинового цикла и, соответственно, влиянии на апоптотическую гибель клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Алесенко А.В.* Функциональная роль сфингозина в индукции пролиферации и гибели клеток // *Биохимия*. — 1998. — Вып. 1. — С. 75—82.
- [2] *Александрова В.А., Рыкова С.В.* Даларгин — фармакологические и клинические аспекты // *Педиатрия*. — 1993. — № 3. — С. 101—104.
- [3] *Грекова Т.И.* Влияние даларгина на течение экспериментальных аритмий сердца // *Эксперим. и клин. фармакология*. — 1994. — № 2. — С. 24—26.
- [4] *Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н.* Липиды. — Киев: Вища школа, 1985. — С. 220—221, 237—238.
- [5] *Львова С.П., Горбунова Т.В., Абаева Е.Н.* Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // *Вопросы медицинской химии*. — 1993. — № 3. — С. 21—24.
- [6] *Орлова Е.А., Комаревцев В.Н.* Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики*. — 2001. — Вып. 6. — С. 206—207.
- [7] *Прохорова М.И.* Липидный и энергетический обмен // *Современные методы биохимических исследований*. — Л., 1982. — С. 94—95.
- [8] *Реброва Т.Ю., Маслов Л.Н., Лишманов А.Ю., Там С.В.* Стимуляция μ - и δ -опиатных рецепторов и устойчивость изолированного сердца к окислительному стрессу: роль NO-синтазы // *Биохимия*. — 2001. — Вып. 4. — С. 520—528.
- [9] *Сирота Т.В.* Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы медицинской химии*. — 1999. — № 3. — С. 43—53.
- [10] *Iwata M., Prington I.H., Zager R.A.* Sphingosine: A mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance // *Proc. Natl. Acad. Set. USA*. — 1995. — V. 92. — № 4. — P. 8970—8974.

INFLUENCE OPIOIDS ON OXIDIZING STRESS AND SPHINGOSINE WAY OF ACTIVATION OF APOPTOSIS IN KIDNEYS

Y.A. Belous

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

I.A. Komarevtseva, K.V. Komarevtseva

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

It was established that dalarginum injection before AKF (acute kidney failure) formation prevented decrease of the contents sphingosine and fragmentations DNA, increas of SOD (superoxiddismutase) in the kidneys.

The probability of correlation connection between at the activation of sphingomyelin cycle and the state of antioxidant systems which can influence on the regulation of apoptosis is determined.

Key words: dalarginum, sfingosine, opioids, fragmentations DNA.