

Экспериментальное моделирование гемозависимого экзофтальма

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты экспериментального моделирования гемозависимого экзофтальма у мышей линии DBA/2. Моделирование экзофтальма проводилось посредством однократной внутрибрюшинной инъекции тетракалиевой соли копропорфирина III с последующей активацией солью металла-координатора. Показано, что введение копропорфирина в количестве 430 мкмоль/л эквивалентно возрастанию концентрации гема и продуктов его распада в крови подопытных животных. Свободнорадикальная природа гемозависимого экзофтальма подтверждается результатами электронного парамагнитного резонанса проб сыворотки крови подопытных животных, где обнаружены радикалы гидроксила в концентрации около 10 мкмоль/л. Динамика концентрации свободных радикалов проанализирована по изменению инфракрасных спектров образцов крови подопытных животных, взятых в разное время после активации копропорфирина. Показано, что ход временной зависимости инфракрасных спектров хорошо коррелирует с расчетной зависимостью концентрации свободного радикала, являющегося конечным продуктом цепной последовательности окислительно-восстановительных реакций, индуцированных супероксидом. Результаты исследования открывают возможность количественной оценки функционирования антиоксидантной системы организма, подвергшегося атаке свободных радикалов. В качестве сопутствующего эффекта при моделировании экзофтальма отмечено, что в течение временного интервала, соответствующего области максимальной концентрации радикала, у подопытных животных наблюдается судорожное состояние, сходное с опистотонусом человека. Отмеченный эффект позволяет развить новый подход к исследованию ряда неврологических состояний и симптомов, возникающих при столбняке, синдроме Криглера – Найяра и при дислокационных синдромах повреждения головного мозга.

Ключевые слова: экзофтальм, гем, свободные радикалы, антиоксидантная система, инфракрасная спектроскопия крови, коллективные состояния плазмалеммы.

Введение. Экспериментальные модели полимиозита формы Вагнера – Унферрихта и гемозависимого экзофтальма разработаны на мышах линии DBA/2 при изучении патологического воздействия свободных радикалов на организм и роли его антиоксидантной системы (АОС) в регуляции гомеостаза. Возникновение экзофтальма, являющегося частичной моделью инсульта, и других гемозависимых патологий у мышей исследуется нами более 10 лет [1, 9–11]. Известно, что многие социально значимые заболевания человека: ишемический инсульт [1–3], ишемия и инфаркт миокарда, в том числе при полимиозите формы Вагнера – Унферрихта [4], диабет, болезнь Альцгеймера [5, 6], тесно связаны с поражением сосудов [6–8], а также кровоизлияниями различной дислокации и степени выраженности: от диапедезных [4] до образования гематом, например, за глазным яблоком [9], или внутри мозга [8]. Механизм действия свободных радикалов на систему организма во многих случаях проявляется как перенос электрона [4, 10] через плазмалемму клеток сосудов, кардиомиоцитов, нейронов и их отростков, форменных элементов крови и волокон скелетной мускулатуры, сопровождающийся перекисным окислением липидов плазмалеммы и, по-видимому, микроперфорацией последней.

Цель исследования. Изучение механизмов возникновения и развития патологических состояний, имеющих свободнорадикальную природу, на примере модели гемозависимого экзофтальма и осуществление с помощью математических методов проекции физико-химических процессов одноэлектронного переноса через плазмалемму на события, сопутствующие нейрогуморальной регуляции функций организма.

Материалы и методы. Моделирование экзофтальма и гемозависимой патологии проводилось посредством внутрибрюшинной инъекции водного раствора тетракалиевой соли копропорфирина Ш (копропорфирина) с последующей активацией раствором соли металла-координатора. Подопытные животные разделялись на две группы: легкие (неполовозрелые) мыши с массой тела менее 17 г и тяжелые (половозрелые) экземпляры с массой тела от 18 г до 25 г. Общее число мышей обоего пола в опытах составило около 400.

Свободные радикалы в сыворотке крови подопытных животных исследовали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [1]. Исследование временной зависимости концентрации свободных радикалов проводилось по инфракрасным (ИК) спек-

трам проб крови мышей [12] на Фурье спектрометре «ФСМ-1201» в диапазоне 1200 см^{-1} – 3400 см^{-1} . Пробы крови забирались в разные временные промежутки после активации копропорфирина у необработанных мышей и у животных, подвергнутых инъекции копропорфирина и его активации, на временном интервале до 1 ч после инъекции.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что моделирование гемозависимого экзофтальма у мышей сопровождается сопутствующим эффектом, проявляющимся как судорожное состояние. Через несколько минут после внутрибрюшинного введения раствора копропорфирина в количестве 430 мкмоль/л и активации его металлом-координатором, инициирующим индукцию свободных радикалов, у всех подопытных мышей наблюдается состояние оцепенения или пониженной двигательной активности, которое продолжается около 10 мин. В группе мышей с массой тела более 22 г состояние оцепенения имеет особенности: собравшись в тесную группу в углу садка, животные перестают двигаться, при этом многие из них стоят на задних лапах, вытянув шею, чего не наблюдается в группе лёгких мышей. После истечения указанного времени мыши начинают произвольные передвижения по клетке. Начало двигательной активности у тяжёлых мышей сопровождается, как правило, поочерёдным вытягиванием передних и задних конечностей, а также спины и шеи – животные разминаются после напряжённой статической позы, напоминающей опистотонус человека.

Основной эффект наступает через 1,5–2,5 ч после введения индукторов свободных радикалов. При этом примерно у 10% тяжёлых мышей лопается сосуд за глазным яблоком [9] и возникает гематома, выдавливающая его из глазницы наружу. В отдельных случаях

у единичных животных патология была двусторонней. Экзофтальму предшествует помутнение роговицы, а через сутки глаз принимает форму конуса и сморщивается. В отдельных случаях поражённый глаз вытекает, что положительно сказывается на продолжительности жизни мышей – животные с экзофтальмом живут, как правило, недолго, так как развитие воспалительного процесса приводит их к преждевременной гибели.

При моделировании экзофтальма в пробах регистрировались аддукты свободных радикалов, в частности, гидроксила (OH^-) в концентрации около 10 мкмоль/л . Показано, что типичный ИК-спектр крови подопытных животных состоит из серии полос поглощения, имеющих различную ширину и форму (рис. 1). В области основных частот водной основы образцов в диапазоне 1200 см^{-1} – 3400 см^{-1} отчетливо наблюдаются три характерные полосы поглощения, присутствующие как в спектрах образцов крови интактных животных, так и в спектрах крови животных, подвергнутых инъекции копропорфирина в концентрации 430 мкмоль/л .

ИК-спектры поглощения в указанном диапазоне представляют слабо разрешенные дублеты с частотами 1550 см^{-1} и 1645 см^{-1} , а также синглеты на частоте 3195 см^{-1} для интактных мышей (кривая 1) и на частоте 3160 см^{-1} для мышей, подвергнутых инъекциям копропорфирина (кривая 2). В обоих спектрах наблюдается также широкая полоса поглощения на частоте 2125 см^{-1} , интенсивность и положение которой сохраняются во всех спектрах. Поддающееся количественной оценке различие в рассматриваемых спектрах состоит в изменении отношения амплитудных значений линий поглощения на указанных частотах для мышей обеих групп. Как в ИК-спектрах образцов крови отдельных животных, так и в усредненных по группам спектрах отношение пиков на указанных частотах следующее:

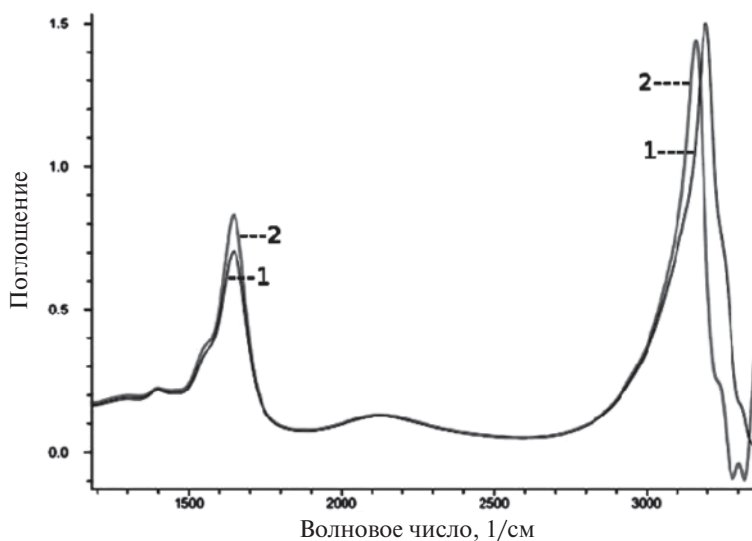


Рис. 1. ИК-спектры поглощения образцов крови мышей. 1 – спектр, усредненный по контрольной группе, 2 – спектр, усредненный по группе, подвергнутой инъекции копропорфирина

$$\frac{A_{1645}^{(1)}}{A_{3195}^{(1)}} < \frac{A_{1645}^{(2)}}{A_{3160}^{(2)}} \quad (1)$$

Для приведенного на рисунке 1 набора из двух спектров (1 и 2) указанные отношения неравенства (1) имеют значения 0,467 и 0,578 соответственно. Столь существенное различие отношения амплитуд характерных пиков спектра, возможно, послужит основой для разработки методик ИК-спектроскопии биологических жидкостей для диагностики и мониторинга заболеваний и радиационных поражений, патогенез которых обусловлен свободными радикалами. Динамика рассматриваемых процессов может быть прослежена по изменению отношения указанных пиков в ИК-спектрах образцов крови животных, взятых в разное время после внутрибрюшинной инъекции копропорфирина. Результаты эксперимента для усредненных по разным временным интервалам спектров проб, взятых в диапазоне от 10 мин до 1 ч после инъекции, представлены на рисунке 2.

Из анализа динамики развития патологического процесса (в данном случае гемозависимого экзофтальма) следует, что основные отклонения от уровня гомеостаза в организме животного происходят в начальной стадии моделирования, а сама катастрофа – существенно позже [9], уже на уровне концентрации радикалов в сыворотке близком к нормальному, что, естественно, осложняет диагностику и понимание природы заболевания.

Установлено, что развитие патологии при экспериментальном моделировании экзофтальма у мышей с массой тела от 17 до 25 г происходит в соответствии с цепной последовательностью окислительно-восстановительных реакций, которые сопровожда-

ются взаимопревращением свободных радикалов, подобно тому, как это было ранее рассчитано нами [13]. Не перечисляя всю совокупность возможных реакций, построим энергетическую диаграмму цепи активации радикалов при моделировании гемозависимого экзофтальма (рис. 3), расположив на оси ординат потенциальные уровни свободных радикалов по убыванию нормальных электродных потенциалов реакционных продуктов. При этом электродный потенциал всех конечных радикалов составляет 0,88 В [15].

Нами [10] ранее показано, что при облучении водного раствора копропорфирина светом на длине волны 630 нм энергия излучаемого фотона соответствует значению около 2 эВ, при этом образуется возбужденная форма молекулы O_2 – синглетный кислород (O_2^*). Молекула копропорфирина содержит тетрапиррольное кольцо с чередующимися двойными и одинарными связями, которое является структурной основой гема гемоглобина позвоночных (*Vertebrata*) и хлорофилла растений. Тетрапиррольное кольцо может выполнять роль как донора так и акцептора, поэтому при активации копропорфирина металлокординатором в аэробной среде образуется анион-радикал кислорода (супероксид), что происходит и при окислении свободного, нестабильного гема крови в гемин. Супероксид не является сильным окислителем, тем не менее, при участии ферментов клетки он способен активировать другие радикалы с более выраженными окислительными свойствами. Среди радикалов-участников цепного процесса одноэлектронного переноса наиболее вероятными представляются радикалы HO_2^- ; ClO^- ; NO_3^- ; OH^- . На рисунке 3 эти радикалы отнесены к конечным продуктам цепной последовательности.

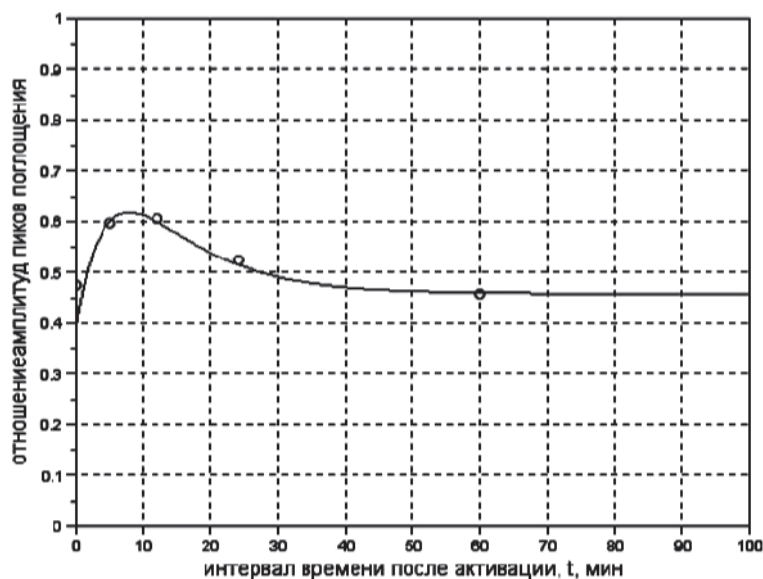


Рис. 2. Динамика отношения амплитуд пиков поглощения в ИК-спектрах крови мышей

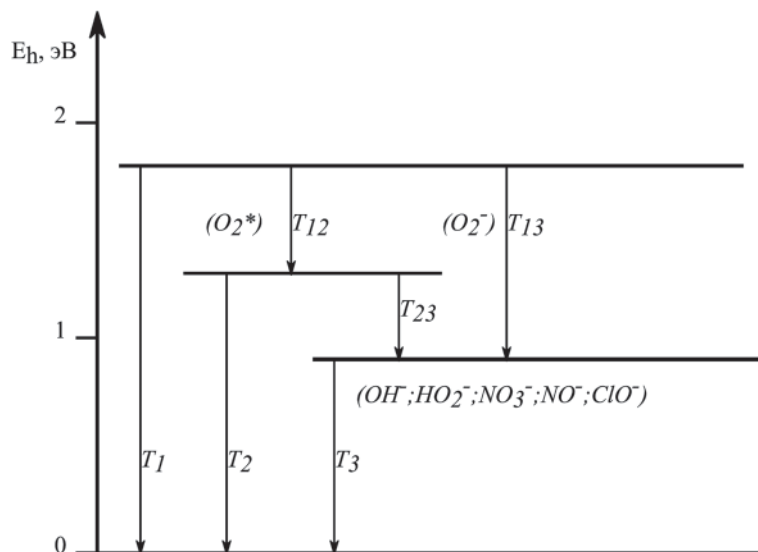


Рис. 3. Энергетическая диаграмма цепи активации радикалов при моделировании гемозависимого экзофтальма

На основе энергетической схемы [13] легко составить систему уравнений, описывающих цепь активации радикалов.

$$\begin{aligned} \frac{dn_1}{dt} &= -\frac{n_1}{T_1} - \frac{n_1}{T_{12}} - \frac{n_1}{T_{13}}; \\ \frac{dn_2}{dt} &= -\frac{n_2}{T_2} + \frac{n_1}{T_{12}} - \frac{n_2}{T_{23}}; \\ \frac{dn_3}{dt} &= -\frac{n_3}{T_3} + \frac{n_2}{T_{23}} + \frac{n_1}{T_{13}}. \end{aligned} \quad (2)$$

Указанные в уравнениях (2) и на рисунке 3 времена релаксации радикалов T_i и T_{ij} в определенной мере отражают кинетику окислительно-восстановительных процессов в организме, следовательно, могут служить количественной мерой эффективности АОС и наследственной предрасположенности к поражению свободными радикалами.

Показано, что пересчитанное в единицы концентрации по отношению к содержанию копропорфирина, отношение амплитуд пиков поглощения ИК-спектров демонстрирует ту же динамику, что и изменение концентрации радикалов, являющихся конечными продуктами цепной реакции (совпадение кривой 3 и экспериментальных точек на рисунке 4).

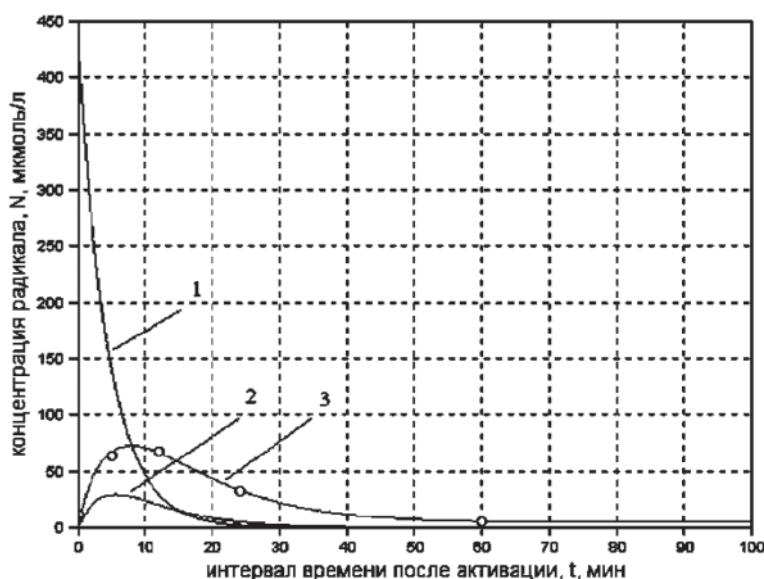


Рис. 4. Изменение во времени концентрации радикалов в условиях трехзвенной цепной реакции при моделировании гемозависимого экзофтальма. 1 – источник первичного радикала, 2 – вторичные радикалы, 3 – конечные продукты

Сравнение экспериментальных результатов с данными компьютерного моделирования цепной реакции дает возможность количественной оценки функционирования АОС организма по набору времен релаксации, отражающих скорости окислительно-восстановительных реакций, в которых происходит активация радикалов. Для исследованной экспериментальной модели гемозависимого экзофтальма у мышей соответствующий набор времен релаксации радикалов имеет вид: $T_1=7,5$ мин; $T_{12}=18$ мин; $T_{13}=30$ мин; $T_2=10$ мин; $T_{23}=10$ мин; $T_3=25$ мин.

Идентификация спектров в высокочастотной области позволяет с большой долей вероятности отнести линии 3195 см^{-1} и 3160 см^{-1} к валентным O–H и деформационным H–O–H колебаниям в олигомерных структурах, отождествляемых с белковыми молекулами, интегрированными в билипидный слой плазмалеммы. Характер изменения полосы при переходе от спектров интактных мышей к спектрам обработанных копропорфирином животных соответствует ослаблению водородных связей, удерживающих интегрированную в билипидный слой полярную молекулу белка. Разрыхление связей облегчает переворот дипольного момента при захвате молекулой такого белка отрицательно заряженного радикала.

В низкочастотной области спектра линии дублета 1550 см^{-1} и 1645 см^{-1} отражают широкий спектр разнообразных движений. Типичными для этой области являются деформационные колебания молекул водной основы, тем не менее, довольно большая суммарная ширина дублета указывает также на колебания групп CO, CH₂, CH₃ и альдегидных группировок в белках плазмалеммы и клеточного матрикса. Явно выраженное увеличение интенсивности этих колебаний отражает рост внутренней подвижности интегрированных белковых комплексов и билипидного слоя плазмалеммы.

Заключение. Физическая причина экзофтальма, по-видимому, состоит в микроперфорации сосудов, вызываемой перекисным окислением липидов плазмалеммы конечными продуктами цепной реакции. Появление гематомы за глазным яблоком можно также объяснить атакой свободных радикалов, неизбежно возникающих при поглощении световых квантов оптической системой глаза, а также клетками фоторецепторов и кровеносных сосудов с нативным гемом и инъецированным копропорфирином.

Таким образом, атаку свободных радикалов из жидкой среды организма можно рассматривать как основную причину патологических состояний со свободно-радикальной природой. Собственно процесс переноса электрона обусловлен переворотами электрических моментов в дипольной белковой сети (мозаики) билипидного слоя, которые сопровождаются изменением структуры водородных связей и

конформационными переходами в молекулах белков, интегрированных в плазмалемму клеток. Отражением этого процесса служит изменение ИК-спектров основных биологических жидкостей организма, в данном случае крови.

Литература

1. Листов, М.В. Экспериментальное обоснование свободно-радикальной этиологии системных заболеваний соединительной ткани на моделях полимиозита и гемозависимого экзофтальма / М.В. Листов, Д.К. Торопов, Г.Г. Родионов // ДАН – 2007. – Т. 414. – № 5. – С. 715–717.
2. Зырянов, С.К. Клинико-экономический анализ эффективности кортексина у больных с полушарным ишемическим инсультом в остром и раннем восстановительном периоде в условиях специализированных сосудистых центров / С.К. Зырянов [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. – № 3 (39). – С. 69–74.
3. Власов, С.С. Фибрилляция предсердий: эндогенные инотропные факторы у больных ишемической болезнью сердца с различными вариантами течения аритмии / С.С. Власов [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2011. – № 2 (34). – С. 79–83.
4. Листов, М.В. Экспериментальное моделирование полимиозита формы Вагнера - Унферрихта на мышцах линии DBA/2 / М.В. Листов, А.И. Мамыкин, Л.П. Тихонова // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2012, – № 4 (40). – С. 143–147.
5. Богданова, Е.А. Особенности ишемии миокарда у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с ишемической болезнью сердца по данным суточного мониторирования электрокардиограммы / Е.А. Богданова [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2011. – № 1 (37). – С. 44–48.
6. Гайкова, О.Н. Морфологические особенности нейронов коры головного мозга при деменции альцгеймеровского типа и сосудистой деменции / О.Н. Гайкова [и др.] // Вест. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. № 3 (39). – С. 193–200.
7. Шангин, А.Б. Сосудистая патология головного мозга и синдром частичного андрогенного дефицита – сложная клиника или общий фактор патогенеза? / А.Б. Шангин, В.Я. Апчел, Е.И. Рябенко // Вест. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. № 1 (37). – С. 286–290.
8. Холявин, А.И. Стереотаксическая криодеструкция глиом головного мозга: оценка данных послеоперационной томографии / А.И. Холявин [и др.] // Вест. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. № 1 (37). – С. 8–13.
9. Листов, М.В. Экспериментальная модель гемозависимого экзофтальма у мышей линии DBA/2 / М.В. Листов // Усовершенствование способов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, медико-биологических исследованиях и клинической практике. Сб. изобрет. и рац. предлож. – СПб.: ВМА. – 2004. – № 35. – С. 70–71.
10. Листов, М.В. Фото- и химическая активация одноэлектронного переноса при моделировании патологий на мышцах линии DBA/2 / М.В. Листов, А.И. Мамыкин // ДАН – 2011. – Т. 439. № 6. С. 841–843.
11. Листов, М.В. Экспериментальное моделирование патологий на мышцах линии DBA/2. Проведение и блокировка нервного импульса / М.В. Листов, А.И. Мамыкин // Тр. Всеарм. научн.-практ. конф. 24–25 ноября. Инновационная деятельность в Вооружённых силах РФ. – МО РФ, ЛВО, СПб., Военная академия связи. – 2011. – С. 189–191.
12. Листов, М.В. Динамика формирования патогенерирующей дозы свободных радикалов при моделировании гемозависимого экзофтальма по данным ИК-спектроскопии / М.В. Листов [и др.] // Усовершенствование способов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, медико-биологических исследованиях и клинической практике. – СПб.: ВМА. – 2013. – № 44. – С. 48–51.
13. Мамыкин, А.И. Кинетика релаксации свободных радикалов и перенос электрона в жидких субстанциях организма / А.И. Мамыкин, М.В. Листов // Известия СПб ГЭТУ «ЛЭТИ». 2010. – № 3. – С. 55–60.

14. Мамыкин, А.И. Одноэлектронный механизм блокировки и проведения нервного импульса. Опистотонус, как неврологический симптом /А.И. Мамыкин, М.В. Листов // Тр. I Междунар. интернет-конф. Казань, 24–25 янв. 2013 г. «На стыке наук. Физ.-хим. серия», – Изд-во Казанского университета. – Казань. – 2013. – С. 170–176.
15. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. М.: Химия. – 1971. – 454 с.

M.V. Listov, A.I. Mamykin

Experimental modeling of heme-induced exophthalmos. physicochemical mechanisms of single-electron transfer in cell membranes

Abstract. *The results of experimental modeling of heme-induced exophthalmos on line DBA/2 mice are presented. Exophthalmos modeling was conducted by means of a single intraperitoneal coproporphyrin III salt injection with subsequent metal-coordinator salt activation. It is shown that the introduction of coproporphyrin in the amount of 430 mcml/L is equivalent to substantial increase in the concentration of heme and its degradation products in the blood of experimental animals. Free radical nature of heme-dependent exophthalmos is confirmed by electron spin resonance investigations of the serum samples of experimental animals, where hydroxyl radicals were found in a concentration of about 10 mcml/L. The dynamics of free radicals concentration was analyzed to observe the change in infrared spectra of samples of blood of experimental animals, taken at different times after coproporphyrin has been activated. It is shown that the time dependence of infrared spectra correlates well with the calculated dependence of the concentration of free radicals, which are to be the final product of a chain sequence of redox reactions induced by superoxide. The results of the study provide an opportunity to quantify the performance of antioxidant system of the body subjected to be attacked by free radicals. As a side effect in the modeling of exophthalmos it can be mentioned that during the time interval corresponding to the maximum concentration of radicals the experimental animals, fall in a convulsive state, similar to the human opisthotonos. This effect allows developing new approach to the study of a number of neurological pathologies such as tetanus, Crigler – Najjar syndrome, and other similar diseases.*

Key words: *exophthalmos, heme, free radicals, antioxidant system, infrared spectroscopy of blood, the collective states of plasma membrane.*

Контактный телефон: +7-904-615-0321; e-mail: alexmamykin@yandex.ru