

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ИЗОНИАЗИДА С АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-I НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЛИЗОСОМ У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Д. В. Суменкова, Л. М. Поляков, Л. Е. Панин¹

Показана способность изониазида взаимодействовать с аполипопротеином А-I, который можно рассматривать как транспортную форму препарата. Использование комплекса изониазида с аполипопротеином А-I в терапии мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением приводило к повышению в печени свободной активности кислой фосфатазы и катепсина D, сниженной под влиянием микобактерий и препарата. Противовоспалительный эффект изониазида, оцениваемый по активности хитотриозидазы в сыворотке крови, был более выраженным в комплексе с аполипопротеином А-I.

Ключевые слова: изониазид; аполипопротеин А-I; туберкулез; катепсин D; кислая фосфатаза; хитотриозидаза

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемическая ситуация по туберкулезу в мире остается напряженной, а лечение данного заболевания — сложной задачей, требующей комплексного подхода [10, 15]. В числе новых направлений химиотерапии туберкулеза может быть создание средств, сочетающих в себе ряд оптимальных свойств, позволяющих преодолевать проблемы лечения, обусловленные особенностями этиопатогенеза данного заболевания. К числу таких свойств можно отнести лизосомотропность, способность стимулировать фагосомно-лизосомное слияние, модулировать функциональное состояние макрофагов и другие [11]. Одним из вариантов создания таких средств является конъюгация используемых противотуберкулезных препаратов с веществами-носителями, особое место среди которых, на наш взгляд, занимают липопротеины плазмы крови и их белковые компоненты, в частности, аполипопротеин А-I (апоА-I) — основной структурный компонент липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Показан лизосомотропный [4], бактерицидный [14], противовоспалительный и антиоксидантный [13] эффекты ЛПВП и апоА-I. Отмечена способность апоА-I стимулировать процессы регенерации при участии макрофагов [5], улучшать реологические свойства крови [6]. АпоА-I способен взаимодействовать с биологически активными веществами различной химической природы и повышать эффективность их внутриклеточного транспорта [9]. Кроме того, апоА-I как природный компонент является неиммуногенным и легко биодеградируемым носителем.

Поскольку незавершенность фагоцитоза при туберкулезе может быть обусловлена неадекватной активностью гидролаз [8, 12], целью настоящего исследования явилось изучение влияния апоА-I на активность

лизосомальных ферментов у мышей с БЦЖ-индуцированным туберкулезным воспалением на фоне антимикобактериальной терапии изониазидом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 40 мышках-самцах СВА массой 20 – 22 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Диссеминированное туберкулезное воспаление моделировали путем однократного внутривентриального введения 0,5 мг вакцины БЦЖ (“Микроген”, Ставрополь) в 1 мл физиологического раствора [11]. Развитие устойчиво воспроизводимой модели верифицировали через 14 дней патоморфологическими методами. Животные были разделены на 4 основные группы: 1 — инфицированные животные (нелеченый контроль); 2 — инфицированные животные, леченные изониазидом; 3 — инфицированные животные, леченные комплексом апоА-I с изониазидом; 4 — здоровые животные (интактный контроль). Первая группа была разделена на 2 подгруппы в соответствии со сроками выведения животных из эксперимента от момента заражения: через 2 недели и 1,5 месяца. Эти подгруппы отражали состояние животных на момент начала лечения и его завершения, соответственно. Лечение животных начинали через 2 недели после инфицирования и проводили в течение 30 дней. Изониазид (“Биосинтез”, Россия) вводили внутривентриально 2 раза в неделю из расчета 14 мг/кг массы в 1 мл физиологического раствора. Комплекс апоА-I с изониазидом вводили по той же схеме, используя 200 мкг белка. Здоровым животным вводили равный объем физиологического раствора.

АпоА-I выделяли из ЛПВП плазмы крови человека описанным нами ранее способом [7]. Образование комплекса белка с препаратом изучали методом туше-

¹ НИИ биохимии СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

ния триптофановой флуоресценции с расчетом количества мест связывания.

В гомогенатах печени методом спектрофотометрии определяли свободную и общую активность кислой фосфатазы и катепсина D [3]. Активность хитотриозидазы в сыворотке крови оценивали методом спектрофлуориметрии, описанным в литературе [1]. Статистическую обработку результатов проводили по общепринятому методу с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая информативность метода тушения триптофановой флуоресценции при изучении процессов комплексообразования обусловлена различием спектральных характеристик комплекса и свободных веществ. Изучение спектра флуоресценции апоА-I показало, что при возбуждении в области 280 нм белок имеет максимум свечения при длине волны 340 нм. При добавлении аликвот изониазида форма спектров практически не изменялась, отмечался незначительный сдвиг в красную область. Максимальное тушение при полном насыщении препаратом связывающих мест составило 77 %. Обнаруженные изменения флуоресценции триптофана свидетельствуют о внутримолекулярных конформационных перестройках белкового компонента вследствие образования комплекса с лигандом. Количество мест связывания для изониазида на молекуле апоА-I составило около 70. Учитывая известную способность липопротеинов и их белковых компонентов проникать в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, можно с высокой вероятностью предположить повышение эффективности внутриклеточного транспорта изониазида в составе комплекса с апоА-I.

Эффективность использования изониазида в составе комплекса с апоА-I в процессе антимикобактериальной терапии мышей мы изучали по состоянию лизосомального аппарата клеток. Анализ активности гидролаз в печени показал, что через 2 недели после

БЦЖ-инфицирования общая активность катепсина D превышала значение интактного контроля в 2 раза, а через 1,5 месяца возвращалась к величинам нормы (таблица). Свободная активность не изменялась. На фоне лечения изониазидом активность фермента как свободная, так и общая значительно снижались и составили 50 и 65 % от нормы соответственно. Введение апоА-I в комплексе с изониазидом не восстанавливало общей активности катепсина D, но приводило к увеличению его свободной активности в 2,8 раза, превышая значение интактного контроля в 1,4 раза.

Общая активность кислой фосфатазы через 2 недели после инфицирования повышалась в 1,3 раза, а свободная активность снижалась в 1,7 раза по сравнению со здоровыми животными (таблица). Через 1,5 месяца общая активность фермента восстанавливалась, а свободная — продолжала снижаться. На фоне лечения общая активность кислой фосфатазы не отличалась от контрольных групп. Однако свободная активность фермента существенно повышалась относительно нелеченого контроля, но не достигала величин интактного. При этом в группе с введением изониазида в комплексе с апоА-I свободная активность кислой фосфатазы была в 1,3 раза выше по сравнению с группой без апоА-I.

Рост общей активности гидролаз на фоне образования БЦЖ-гранулем может быть связан с активацией биосинтеза ферментов. Снижение свободной активности кислой фосфатазы, вероятно, является следствием ингибирования фермента под действием микобактерий. Следует отметить, что влияние микобактерий на активность тех или иных гидролаз может быть различным в зависимости от вида фермента и степени патогенности возбудителя [8]. Выраженное снижение активности катепсина D в наших экспериментах при лечении изониазидом свидетельствует о возможном подавлении синтеза фермента, которое можно рассматривать как побочное действие препарата.

Повышение свободной активности гидролаз на фоне лечения комплексом апоА-I-изониазид может

Активность ферментов лизосом у мышей с туберкулезным воспалением на фоне терапии изониазидом и его комплексом с аполипопротеином А-I ($M \pm m, n = 8$)

Группа	Катепсин D, у. ед./час на 1 мг белка		Кислая фосфатаза, мкмоль P _i /мин на 1 г белка		Хитотриозидаза, нмоль MUF/мл/час
	свободная	общая	свободная	общая	
Нелеченый контроль (2 недели)	0,185 ± 0,025	1,225 ± 0,035*	2,735 ± 0,2*	16,53 ± 0,688*	891,7 ± 20,88*
Нелеченый контроль (1,5 месяца)	0,143 ± 0,01	0,679 ± 0,042	1,628 ± 0,261*	10,385 ± 0,424	1035,1 ± 65,66*
Изониазид	0,075 ± 0,002* ^S	0,374 ± 0,022* ^S	2,75 ± 0,07* ^S	10,68 ± 0,69	576,5 ± 24,65* ^S
АпоА-I-изониазид	0,208 ± 0,016* [#]	0,376 ± 0,05*	3,515 ± 0,2* [#]	11,53 ± 0,53	447,8 ± 46,14 [#]
Интактный контроль	0,147 ± 0,01	0,569 ± 0,026	4,65 ± 0,19	12,78 ± 0,78	306,4 ± 44,39

* — $p < 0,05$ по сравнению с интактным контролем;

[#] — $p < 0,05$ по сравнению с группой животных, леченных изониазидом;

^S — $p < 0,05$ по сравнению с группой животных нелеченого контроля (1,5 месяца).

быть результатом увеличения количества легко повреждаемых фаголизосом, а также связано с повышением проницаемости мембран лизосом вследствие перегрузки лизосомотропным соединением. Вероятность последнего факта подтверждают ранее проведенные исследования на переживающих срезах печени крыс с использованием теста на осмотическую устойчивость. Было показано, что инкубация срезов, в том числе в гипотонической среде, в присутствии ЛППП приводит к повышению свободной активности катепсина D и кислой фосфатазы без изменения их общей активности и выхода в неосаждаемую фракцию [4]. Повышение свободной активности лизосомальных гидролаз при изучаемой патологии является благоприятным фактором, направленным на уничтожение возбудителя.

Активность хитотриозидазы в сыворотке крови БЦЖ-инфицированных мышей возросла в динамике исследования и через 1,5 месяца превосходила интактный контроль в 3,4 раза (таблица). Источником поступления в кровь данного фермента могут являться стимулированные макрофаги, а уровень его активности отражает интенсивность воспалительного процесса [1]. Данные литературы свидетельствуют о повышении активности хитотриозидазы в сыворотке крови больных с различными формами туберкулеза легких и наиболее выраженной при генерализованной патологии [2]. В наших исследованиях на фоне лечения изониазидом активность хитотриозидазы снижалась, однако при введении препарата в комплексе с апоА-I — в большей степени, что, вероятно, можно рассматривать как результат снижения гиперактивности макрофагов и проявление противовоспалительных свойств белка.

ВЫВОДЫ

1. На одной молекуле аполипопротеина А-I обнаружено около 70 мест для связывания изониазида, что

является предпосылкой использования белка в качестве транспортной формы препарата.

2. Использование комплекса аполипопротеина А-I с изониазидом в курсе интермиттирующей антимикробактериальной терапии в условиях эксперимента повышает свободную активность кислой фосфатазы и катепсина D, сниженную под влиянием микобактерий и препарата.

3. Введение изониазида в комплексе с аполипопротеином А-I в большей степени снижает активность хитотриозидазы — маркера стимуляции макрофагов и интенсивности воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Короленко, С. Я. Жанаева, О. Ф. Фаламеева и др., *Бюл. exper. биол.*, **130**(10), 391 – 394 (2000).
2. Т. А. Короленко, М. С. Черканова, *Вестн. РАМН*, № 11, 39 – 45 (2009).
3. *Лизосомы. Методы исследования*, Дж. Дингл (ред.), пер. с англ., 2-е изд., Мир, Москва (1980).
4. Л. Е. Панин, *Вопр. мед. химии*, **33**(5), 96 – 102 (1987).
5. Л. Е. Панин, *Бюл. СО РАМН*, **104**(2), 8 – 14 (2002).
6. Л. Е. Панин, В. Н. Бутусова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, *Бюл. exper. биол.*, **148**(9), 273 – 276 (2009).
7. Л. М. Поляков, Д. В. Суменкова, Р. А. Князев, Л. Е. Панин, *Биомедицинская химия*, **57**(3), 308 – 313 (2011).
8. В. А. Созинов, И. П. Метелицина, Е. К. Плотникова и др., *Проблемы туберкулеза*, № 5, 44 – 47 (1993).
9. Д. В. Суменкова, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Новосибирск (2010).
10. М. В. Шилова, *Туберкулез в России в 2009 г.*, РПЦ Прима, Москва (2010).
11. В. А. Шкурूपий, *Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия*, РАМН, Москва (2007).
12. S. Sturgill-Koszycki, U. E. Schaible, D. G. Russell, *EMBO J.*, **15**(24), 6960 – 6968 (1996).
13. F. Tabet, K.-A. Rye, *Clinical Science*, **116**, 87 – 98 (2009).
14. N. Tada, T. Sakamoto, A. Kagami, et al., *Mol. and Cell. Biochem.*, **119**(1 – 2), 171 – 178 (1993).
15. H. Tomioka, K. Namba, *Kekkaku*, **81**(12), 753 – 774 (2006).

Поступила 02.12.11

INFLUENCE OF ISONIAZID COMPLEX WITH A-I APOLIPOPROTEIN ON ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN MICE WITH TUBERCULOUS INFLAMMATION MODEL

D. V. Sumenkova, L. M. Polyakov, and L. E. Panin

Institute of Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117, Russia

It is established that isoniazid (isonicotinic acid hydrazide) can interact with A-I apolipoprotein to form a complex, which can be considered as the transport form of the preparation. The use of this complex for the treatment of mice with BCG-induced tuberculous inflammation led to an increase in the free activities of acid phosphatase and cathepsin D in the liver, which was decreased under the action of mycobacteria and the free form of isoniazid. The isoniazid complex with A-I apolipoprotein exhibited more expressed anti-inflammatory effect (estimated by the activity of chitotriosidase in blood serum) as compared to the free drug.

Key words: Isoniazid (isonicotinic acid hydrazide); A-I apolipoprotein; tuberculosis; cathepsin D; acid phosphatase; chitotriosidase