

АКТИВАЦИЯ СУПЕРОКСИДПРОДУЦИРУЮЩЕГО ЛИПОПРОТЕИНА ИОНАМИ НЕКОТОРЫХ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Г.М. СИМОНЯН*, М.А. БАБАЯН**, Р.М. СИМОНЯН**, М.А. СИМОНЯН**

*Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци, 375025

** Институт биохимии НАН Армении, 375014, Ереван

Путем присоединения следов не только ионов Fe^{+3} , но и Cu^{+2} супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки крови (супрол) продуцирует супероксидные радикалы как *in vivo*, так и *in vitro*.

Արյան շիճուկի գերօքսիդ-գոյացնող լիպոպրոտեինը (սուպրոլ), ոչ միայն Fe^{+3} , այլ և Cu^{+2} իոնների հետքերը միացնելու ճանապարհով, գոյացնում է սուպերօքսիդային ռադիկալներ ինչպես *in vivo*, այնպես էլ *in vitro* պայմաններում:

The superoxide-producing lipoprotein of blood serum (suprol) produces the superoxide radicals by binding not only the traces of Fe^{+3} , but also Cu^{+2} ions both *in vivo* and *in vitro*.

Супероксидный радикал – липопротеин – супрол – ионы Fe^{+3} , Cu^{+2}

Показано [1], что в сыворотке крови животных (крысы, овцы, кролика, быка и т.д.) и человека присутствует новый тип липопротеина высокой плотности, способный продуцировать супероксидные радикалы после присоединения к себе следов ионов Fe^{+3} . Этот липопротеин содержит восстановленную NADPH- группу, что служит источником электрона для восстановления Fe^{+3} до Fe^{+2} , и последний путем передачи электрона молекулярному кислороду превращает его в супероксидный радикал (O_2^-). В таком состоянии супрол действует как энергичный источник O_2^- , в определенных концентрациях стимулирует лейкопоз, подавляет рост лимфосаркомы Плисса и ускоряет пролиферацию клеток в культуре [2].

Целью этой работы являлось активирование супрола не только ионами Fe^{+3} , но и Cu^{+2} в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материал и методика. Опыты проводили на белых половозрелых крысах весом 180-200г, разделенных на три группы, по 10 крыс в каждой: контрольная, ОП-1, ОП-2.

Животные контрольной группы получали по 1мл физраствора, ОП-1 группы – по 1 мл физраствора, в котором растворено $2 \times 10^{-4} M FeCl_3$, а животные ОП-2 группы – по 1 мл физраствора с $2 \times 10^{-3} M CuCl_2$ внутривенно и были декапитированы через 2 часа после подачи солей.

Супрол из сыворотки крови (по 20 мл) животных каждой группы выделяли и очищали одновременно в одинаковых условиях по описанному методу [1], несколько видоизмененному. В частности, к очищенной и отдиализованной против воды сыворотке (форменные элементы плазмы заранее удаляли центрифугированием при 10000 g, 15 мин) добавляли по 1мл HCl до получения стабильного осадка, который собирали центрифугированием, и после растворения в 0,2 М калий-фосфатном буфере при pH 7,4 (КФБ) подвергали ионнообменной хроматографии на KM-52 и DE-52 целлюлозах (Whatman, Англия), затем гельфилтрации на биогеле P-150 (Reanal, Венгрия); центральную слабо-желтую фракцию супрола концентрировали на DE-52 целлюлозе.

Для продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) супрол активировали также по методу [1], к отдиализованному (против воды) раствору супрола добавляя $FeCl_3$ (10^{-3} М) или столько же $CuCl_2$, до получения осадка, который получали центрифугированием. Осадок растворяли в 0,02 М КФБ. Неприсоединившиеся к липопротеинам ионы Fe^{+3} или Cu^{+2} удаляли пропусканием раствора супрола через сефадекс G-10.

Супероксидные радикалы обнаруживали в реакционной смеси двумя различными методами:

восстановлением нитротетразолиевого синего (НТС) до формазана [10] (реакционная смесь содержала 50 мкМ НТС, 5 мкМ феназинметасульфата, 50 мкМ NADPH-Na, 0,4 М пиррофосфатного буфера, рН 8,3; за ходом реакции следили по поглощению формазана при 588нм);

окислением адреналина в адrenoхром (реакционная смесь содержала 0,01 М адреналина, 50 мг лимонной кислоты, 0,2 Na-карбонатного буфера, рН 10,2; за ходом реакции следили по образованию адrenoхрома при 500 нм [9]).

Во всех случаях объем реакционной смеси составлял 2,5 мл.

Для дисмутации образовавшегося O_2^- использовали $Cu-Zn$ -супероксиддисмутазу (СОД). Содержание железа в исследуемых пробах определяли *О*-фенантролином [3], а содержание меди — спектрофотометрически [3].

О супероксидпродуцирующей способности судили по величине прироста плотности оптического поглощения образовавшегося формазана (А588) или адrenoхрома (А500) в присутствии 0,1 мг/мл супрола. Количество белка в растворах супрола определяли по методу Лоури [8].

Оптические спектры поглощения регистрировали спектрофотометром "Specord M-40" (Германия), в кюветах с длиной оптического пути 1см при 20°.

Результаты и обсуждение. Количество полученного супрола составляло: из сыворотки крыс контрольной группы - 40, ОП-1 группы - 25, ОП -2 - 21 мг.

На рис.1 приведены оптические спектры поглощения супрола, полученного из сыворотки крыс экспериментальных групп. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выход супрола в ОП-1 или ОП-2 группах почти в два раза меньше по сравнению с контрольной. Это, вероятно, связано с тем, что введенные в кровь ионы Fe^{+3} или Cu^{+2} также захватываются супролом, в результате чего начинается продуцирование этим липопротеином сыворотки O_2^- , которые и инициируют процесс ПОЛ фосфолипидов в самом супроле. Это приводит к самоагрегации (потере растворимости) супрола, многократно показанной в опытах *in vitro*, что уменьшает выход супрола по приведенной методике [1]. При этом оптические спектры поглощения супрола

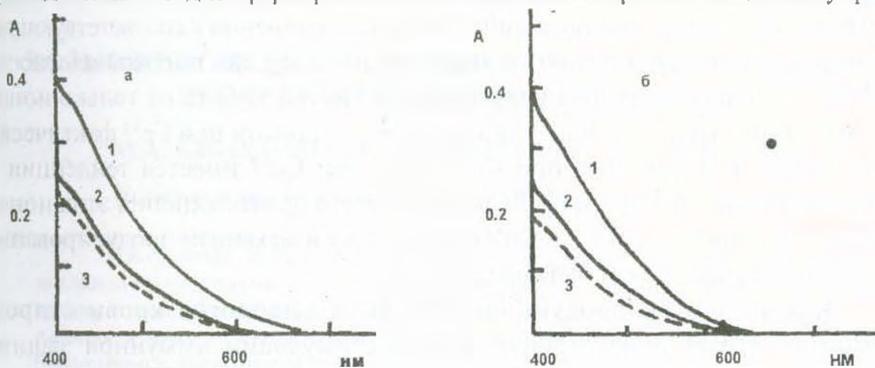


Рис. 1. Оптические спектры поглощения супрола в неактивном (а) и активированном (б) состояниях: а) спектры супрола у контрольных животных (1), то же самое у ОП-1 (2) и ОП-2 (3) групп; б) спектры супрола после активации у контрольной (1), ОП-1 (2) и ОП-2 (3) групп. Во всех случаях супрол растворен в 0,02 М КФБ.

во всех трех группах не претерпевают каких-либо изменений (рис.1) после присоединения следов ионов Fe^{+3} или Cu^{+2} (эти количества колеблются в пределах 0,01-0,03мг на мг липопротеина).

Как показано на рис.2, супрол контрольной группы активируется не только ионами Fe^{+3} , но и Cu^{+2} , не только *in vitro*, но и *in vivo* (б-2,3). Ионы Fe^{+3} или Cu^{+2} в условиях *in vitro* активируют супрол значительно больше, чем *in vivo*. Вероятно, это связано, во-первых, с конкуренцией за захват этих ионов трансферрином или церулоплазмином - основными металлопротеинами сыворотки антиоксидантного характера - и, во-вторых, супролом со сроками инкубации после введения этих ионов, а также их количеством.

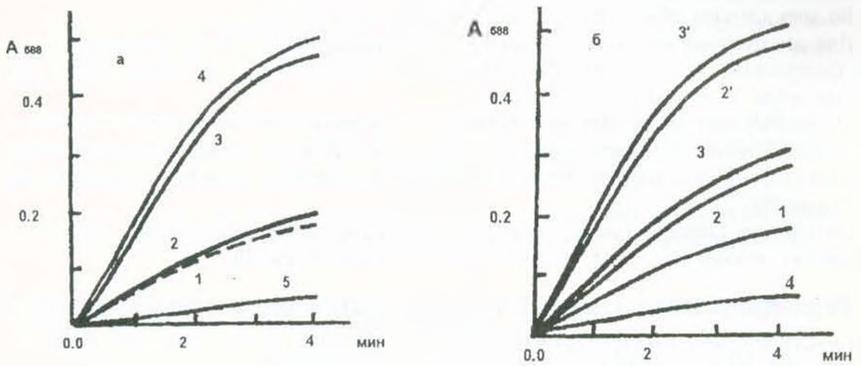


Рис.2. Кинетические кривые образования формазана при A588 нм (или адренохрома при A500 нм) под влиянием супрола.

а) кинетические кривые образования формазана (или адренохрома) в отсутствие супрола (1), в присутствии 0,1мг/мл неактивного (интактного) супрола контрольной группы (2); то же самое в присутствии 0,1мг/мл супрола после его активации ионами Fe^{+3} (3) и Cu^{+2} (4) и после добавления к (3) или (4) $5 \times 10^{-6}M$ СОД (5).

б) кинетические кривые образования формазана (или адренохрома) в отсутствие супрола (1), в присутствии 0,1мг/мл супрола из ОП-1 группы (2) или из ОП-2 группы (3) и после их активации ионами Fe^{+3} (2') и Cu^{+2} (3'), а в присутствии $5 \times 10^{-6}M$ СОД (5) во всех группах получается кривая (4).

Известно, что в организме нет “свободных” ионов железа (меди), хотя, особенно при патологических состояниях, их количество возрастает в синовиальных и цереброспинальных жидкостях [5]. Возможно, в этих состояниях (при нарушении метаболизма этих металлов [1]) супрол действует не только как фактор, переносящий липидные соединения к соответствующим мишеням, как это свойственно липопротеинам сыворотки высокой плотности [11], но и как источник продуцирования O_2^- путем захвата не только ионов Fe^{+3} , но и Cu^{+2} . При этом продуцирование O_2^- супролом при Fe^{+3} фактически не отличается от такового при Cu^{+2} , хотя при Cu^{+2} имеется тенденция к повышению этой активности. Возможно, место присоединения этих ионов в молекуле супрола для Fe^{+3} и Cu^{+2} одно и то же и механизм продуцирования O_2^- в обоих случаях может быть следующим:

Как источник продуцирования O_2^- в сыворотке крови супрол, возможно, играет определенную роль в стимуляции иммунной защиты организма, одним из механизмов которой, как известно, является продуцирование активных форм кислорода (O_2^- , H_2O_2 и их производных [12]) различной субстратной специфичности оксидоредуктазами, локализованными

в мембранах форменных элементов плазмы [4, 7].

Не исключается также, что наряду с ферритином, трансферрином и церулоплазмином, супрол действует также как перехватчик ионов Fe^{+3} или Cu^{+2} , предотвращая их "свободное" действие в организме (последние являются энергичными инициаторами процессов ПОЛ мембран различных биообразований [6]). Активированный ионами меди или железа супрол может быть регулируемым, простым и естественным источником изучения влияния этих активных соединений на различные биосистемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М. Биохимия, 61, 932-938, 1996.
2. Симонян М.А., Карапетян А.И., Галстян А.А., Симонян Р.М., Бабаян М.А. Биохимия, 61, 1578-1583, 1996.
3. Cameron B.F. Anal. Biochem., 11, 164-169, 1965.
4. Dore M., Slauson D.O., Nielson N.R. Pediatr. Res. 28, 327-331, 1990.
5. Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Halliwell B. Biochem. J., 199, 263-265, 1981.
6. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Biochem. J., 219, 1-14, 1984.
7. Jansson G., Harmsringdohl M. Free Rad. Res. Commun., 18, 87-98, 1993.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
9. Misra H.P., Fridovich I. J. Biol. Chem., 247, 3170-3175, 1972.
10. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 849-856, 1972.
11. Stryer L.V. Biochemistry (russ. translation), 2, 218-220, Moscow, 1985.
12. Trisch G.L., Evans R.L. J. Immunol. Meth., 160, 59-64, 1993.
13. Wharton D.S., Rader M. Anal. Biochem., 33, 226-229, 1976.

Поступила 30.IX.1998

Биолог. журн. Армении, 1 (52), 1999

УДК 631.589.2

ВОЗМОЖНОСТИ ГИДРОПОНИКИ В ОБЛАСТИ ПРОИЗВОДСТВА ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОЙ ПРОДУКЦИИ

М.А. БАБАХАНИЯН, Н.З. АСТВАЦАТРЯН, Л.Э. ОГАНЕСЯН

Институт проблем гидропоники НАН Армении, 375082, Ереван

Накопление нитратов овощными культурами в условиях гидропоники исключительно динамично и зависит от культуры, сорта, условий окружающей среды, применяемой технологии возделывания, интенсивности минерального питания и времени суток. Поглощение и усвоение нитратов является отражением биологически активного или пассивного состояния растений и носит ритмичный, волнообразный характер, возрастающий при подпитываниях питательным раствором; в условиях водного дефицита в растениях поддерживается устойчивое количество нитратов. Содержание тяжелых металлов (Sn, Mo, Pb, Ni, Cu, Mn, Ti) в почвенных и гидропонных растениях изменчиво и зависит от онтогенетических