

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 616.36.004

РЕГУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ТОКОФЕРОЛА НА УРОВЕНЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ КРОВИ У КРЫС

Л.А. СИМОНЯН, Г.М. СИМОНЯН, А.А. СИМОНЯН, М.А. СИМОНЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Буянтяна НАН РА, 375014, Ереван

Пентилентетразоль-индуцированный эпилептический припадок (ПЭП) у белых крыс вызывает общее повышение эндогенных уровней анти- и прооксидантного действия металлопротеинов (за исключением каталазы и цитохрома b₂), вызывая дисбаланс между антиоксидантным и прооксидантным статусом сыворотки крови и эритроцитов. Это создает соответствующий фон оксидативного повреждения крови, приводящий к гибели животных. α-Токоферол в основном играет антистрессорную и антиэпилептическую роль.

Ափսոսակ առնետների մոտ պենտիլենտետրազոլով հարուցված էպիլեպտիկ նոպան բարձրացնում է արյան հակա- և պրոօքսիդանտային գործողության մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակները (բացի կատալազից և ցիտոքրոմ b₂), առաջ բերելով արյան շիճուկի և էրիթրոցիտների հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների հաշվեկշիխախտում: Սա հանգեցնում է արյան օքսիդատիվ վնասման և կենդանիների մահվան: α-Տոկոֆերոլը հիմնականում ցուցաբերում է հակասթրեսային և հակաէպիլեպտիկ դեր:

At penthylene tetrazole-induced epileptic seizure (PES) of the white rats the increase of the endogenous levels of blood anti- and prooxidant action metalloproteins (except the levels of catalase and cytochrome b₂) and disbalance between antioxidant and prooxidant statuses of blood serum and erythrocytes take place. It initiates the blood oxidative damage and the death of animals. α-tocopherol on the whole plays the antistressor and antiepileptic role.

Эпилептический припадок - металлопротеины - оксидативный стресс - α-токоферол

При пентилентетразоль-индуцированном эпилептическом припадке (ПЭП) наблюдается пятикратное увеличение уровня активных форм кислорода (АФК), в частности NO[•], перекисей и т.д., в коре головного мозга крыс. Механизм действия противосудорожных препаратов (фенобарбитурол, ламотригин, феназепан, мексидол), а также α-токоферола, связывается с уменьшением уровня АФК [12]. При этом несколько изменяется и функция митохондрий в культуре клеток гиппокампа, нарушается физиологическое равновесие между продуцирующими и утилизирующими АФК биосистемами, и, как результат этого, повышается уровень перекиси водорода, что оказывает повреждающее действие на синаптическую трансмиссию. α-Токоферол и аскорбиновая кислота оказывают при этом защитное действие [14]. Аналогично, препарат мелатонин, также обладающий антиоксидантным действием, защищает ДНК клеток от гидроксильных

радикалов, проявляя противосудорожный эффект [16]. При судорожном припадке, вызванном эпилептогеном — коразолом, антистрессорный и противосудорожный эффект оказывает Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД), вводимая внутривнутрибрюшинно [10]. Однако вопрос о состоянии регуляторных АФК систем крови при судорожных припадках полностью еще не решен.

Цель работы — комплексное исследование количественных изменений известных металлопротеинов антиоксидантного действия (МАД): Cu, Zn-СОД, каталазы, церулоплазмينا (ЦП) и трансферрина (ТФ), и антиоксидантного статуса (АС) в крови крыс при ПЭП под воздействием и при отсутствии α -токоферола. Были исследованы также сдвиги открытых недавно новых типов металлопротеинов прооксидантного действия (МПД): пяти изоформ цитохрома b_{558} сыворотки крови и мембран эритроцитов, супероксидпродуцирующего липопротеина сыворотки — супрола [9], а также цитохрома b_5 , и прооксидантного статуса (ПС) в условиях опыта.

Материал и методика. Белые половозрелые крысы (190-210 г) были разделены на три группы (по 30 крыс в каждой). В первую опытную группу (ОГ-1) вошли животные, получившие внутривнутрибрюшинно по 60 мг/кг массы животного пентилентетразоля (100%-ная летальная доза), который смешивали с 1 мл физиологического раствора и вводили каждой крысе. Во второй опытной группе (ОГ-2) через 10 мин после введения ПТ животные получали α -токоферол (по 10 мг/кг массы), смешанный с 1 мл физиологического раствора.

В ОГ-1 у крыс первые признаки судорожного припадка, вызванного ПТ, проявлялись уже через 12-14 мин после введения. Интенсивные судороги и гибель их наступали уже через 30-35 мин после введения ПТ. В ОГ-2 (при введении α -токоферола) через 25-30 мин наблюдались слабые признаки судорожного припадка, при этом животные не погибали.

После декапитации крыс под легким эфирным наркозом у вышеприведенных групп брали кровь, стабилизируя ее 2%-ным оксалатом натрия. Кровь пяти крыс (по 25 мл) была выделена для получения МАД и МПД.

МАД (Cu, Zn-СОД и каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов; ЦП и ТФ — из сыворотки крови), МПД (цитохромы: b_5 — из растворимой фракции эритроцитов; $b_{558}I$ и $b_{558}II$ — из сыворотки крови; $b_{558}III$, $b_{558}IV$ и нейтральный цитохром b_{558} — из мембран эритроцитов; супрол — из сыворотки крови) выделяли разработанным нами биотехнологическим методом [9]. При этом детергент для сольubilизации эритроцитарных мембранных белков не применялся, т.к. он снижает стабильность цитохромов b_{558} и затрудняет процесс очистки и выявления физико-химических свойств и активности этих гемопротеинов. При этом цитохром $b_{558}III$ (новый структурно-функциональный компонент мембран эритроцитов) получали электрофоретически в гомогенном состоянии. Количество полученных металлопротеинов определяли путем регистрирования величины плотности, характерной для данного белка максимального оптического поглощения, которое составляет для цитохрома b_5 525 нм; для изоформ цитохрома b_{558} — 530 нм; ЦП — 610 нм; ТФ — 470 нм и супрола — 430 нм. СОД-активность фракции и $O_2^{\cdot -}$ - продуцирующую активность супрола и цитохрома $b_{558}III$ определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС). При этом учитывали процент уменьшения (в случае СОД) или увеличения (в случае продуцирования $O_2^{\cdot -}$) величины плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), который образуется в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД-активности или $O_2^{\cdot -}$ - продуцирующей активности супрола и цитохрома $b_{558}III$ принимали то количество фракций, которое способно ингибировать или стимулировать образование формазана на 50%. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим титрованием растворов перекиси водорода в отсутствие или присутствии фракций.

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Hitachi" (Япония) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение. При ПЭП наблюдается общее повышение (по сравнению со 100%-ными контрольными показателями) эндогенных уровней МАД и МПД, за исключением цитохрома b5 и каталазы, уровни которых снижены (табл. 1).

Таблица 1. Относительные изменения (%) металлопротеинов крови крыс при судорожных припадках (ОГ-1) и под воздействием α -токоферола (ОГ-2), ($P < 0,05$; $n=6$)

Металлопротеины и активность	ОГ-1	ОГ-2
Цитохром b_5	$-21,4 \pm 1,3$ ($p < 0,01$)	$+8,4 \pm 0,2$
S Цитохром $b_{558} I+II$	$+288,0 \pm 35,8$ ($p < 0,03$)	$-16,5 \pm 1,2$ ($p < 0,02$)
Цитохром $b_{558} IV$	$+26,6 \pm 2,7$ ($p < 0,01$)	$+19,3 \pm 2,4$
Цитохром $b_{558} III$	$+27,2 \pm 2,5$	$-9,0 \pm 0,6$
Нейтральный цитохром b_{558}	$-71,5 \pm 3,6$ ($p < 0,02$)	$+1,6 \pm 0,1$
Супрол	$+195,0 \pm 8,5$ ($p < 0,01$)	$+2,4 \pm 0,1$
O_2^- – продуцирующая активность цитохрома $b_{558} III$	$+2,6 \pm 0,3$	$-4,3 \pm 0,5$
O_2^- – продуцирующая активность супрола	$+7,0 \pm 1,1$	$-14,9 \pm 2,0$
ЦП	$+150,0 \pm 17,4$ ($p < 0,03$)	$+5,0 \pm 0,3$
ТФ	$+28,5 \pm 2,2$	$+2,1 \pm 0,2$
СОД	$+41,1 \pm 3,0$ ($p < 0,03$)	$+16,1 \pm 0,7$
Каталаза	$-66,7 \pm 4,4$ ($p < 0,001$)	$+52,6 \pm 4,1$ ($p < 0,01$)

Таким образом, при ПЭП интенсивность аэробных метаболических процессов повышается. Снижение уровня цитохрома b_5 может быть связано с повышением подвижности животных [1]. Предположительно, понижение уровня каталазы связано с повышением ее расходования в процессе нейтрализации растущих уровней H_2O_2 при ПЭП, не исключается и инактивирование каталазы супероксидными радикалами [15]. Представляет определенный интерес резкое повышение (в 3 раза) уровня сывороточного цитохрома b_{558} . Можно предположить, что при ПЭП в сыворотке крови резко повышается количество H_2O_2 , которое нейтрализуется цитохромом $b_{558} II$, однако не путем ее расщепления, а «экранирования» [8], что является адаптационным механизмом организма, т.к. в сыворотке крови уровень каталазы незначительный. С другой стороны, следует отметить, что АФК, включая и H_2O_2 , образуются при фагоцитозе, и их наличие в сыворотке крови в физиологических количествах необходимо [13]. Резкое повышение уровня сывороточных цитохромов b_{558} , возможно, связано с эффектом отщепления (рилизинга) нейтрального цитохрома b_{558} из мембран эритроцитов

в сыворотку [11]. Видимо, с этим связано понижение уровня этого цитохрома в эритроцитарных мембранах (табл. 2).

Эффект рилизинга цитохрома b_{558} в сыворотке наблюдается и при острых лимфобластических и миелобластических лейкозах [3]. Эти изменения можно использовать в качестве диагностического теста при ПЭП. Повышение уровня эритроцитарных мембранных цитохромов $b_{558}III$ и $b_{558}IV$ как O_2^- -продуцирующих систем свидетельствует о повышении уровня O_2^- в эритроцитах, также как и перекиси водорода - продукта ферментативного дисмутирования O_2^- . В настоящее время особого внимания заслуживает эритроцитарный мембранный цитохром $b_{558}III$. Удельное содержание цитохрома $b_{558}III$ мембран эритроцитов млекопитающих в 80-100 раз превышает таковое цитохрома $b_{558}III$, локализованного в мембранах клеток иммунной системы [4]. Более того, количество цитохрома $b_{558}III$ мембран водных обитателей, в частности рыбы сиг озера Севан (*Coregonus Lavaretus sevanicus*), в 7-8 раз больше, чем у млекопитающих [5]. Цитохром $b_{558}III$ мембран эритроцитов является ФАД-содержащим, NADPH-зависимым O_2^- -продуцирующим гликогемопротеином. В лигандном окружении Fe^{3+} локализован нитроксильный радикал (NO^*) [6], за счет которого этот цитохром образует с гемоглобином нестабильное комплексное соединение при злокачественных новообразованиях (рак грудной железы у женщин и саркома-45 у крыс [7]). Изменения уровня цитохрома b_{558} мембран эритроцитов так или иначе меняют их текучесть, что способствует оксидативному повреждению эритроцитарных мембран [4].

При ПЭП (ОГ-1) O_2^- -продуцирующая активность супрола и цитохрома $b_{558}III$ особых изменений не претерпевает. Резкое повышение уровня белка острой фазы ЦП [2] и есть ответ на увеличение уровня O_2^- -продуцирующих систем сыворотки (супрола, цитохрома $b_{558}I$ и цитохрома $b_{558}II$). Не исключается и наличие воспалительных процессов, вызванных активными формами кислорода (АФК), уровень которых повышен. Диапазон изменений других МП антиоксидантного действия (ТФ, СОД) присущ ПЭП в ОГ-1. В ОГ-2 под воздействием α -токоферола в большинстве случаев наблюдается тенденция регулирования уровня МП. Однако уровень каталазы, хоть и повышен, но еще не достигает исходных данных.

Приведенные изменения в ОГ-1 являются экстремальными и приводят к гибели животных. Это особенно заметно при суммировании полученных результатов путем расчета антиоксидантного (расчетный суммарный уровень МАД) и прооксидантного статусов (расчетный суммарный уровень МПД) (табл. 2).

Таблица 2. Относительные изменения (%) анти- и прооксидативного статусов крови при ПТ-индуцированных судорожных припадках (ОГ-1) и под воздействием α -токоферола (ОГ-2), ($P < 0,05$; $n=6$)

Компоненты крови	ОГ-1		ОГ-2	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	+178,5±24,3	+490,0±28,5	+7,1±1,2	-28,0±3,3
Эритроциты	-25,6±3,1	+42,7±4,6	+68,7±3,5	+122,0±10,1

Действительно, дисбаланс между этими статусами в сыворотке крови и эритроцитах является основной причиной оксидативного повреждения и, в целом, оксидативного стресса крови в ОГ-1 со смертельным исходом. В ОГ-2 небольшой дисбаланс между этими статусами все же сохраняется в течение 30-40 мин, однако это уже не представляет опасности для жизни животных. Приведенные показатели являются количественными факторами оксидативного стресса при ПЭП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян В.М., Симосян М.А., Манукян А.А., Симосян Р.М., Акопян А.А. Бюлл. Эксп. Биол. Мед., 132, 1062-1064, 2001.
2. Мжельская Т.И. Бюлл. Эксп. Мед., 130, 124-132, 2000.
3. Симосян Г.М. Мед. наука Армении, XLII, 101-103, 2002.
4. Симосян Г.М. Автореф. канд. дисс., Ереван, 2003.
5. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Степанян И.Э., Карапетян А.В., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLIII, 30-38, 2003.
6. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Нерсисян А.К., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLIII, 31-34, 2003.
7. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Симосян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос. мед. университет, Ереван, 48-51, 1999.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М. Способ получения металлопротеинов крови. Изобретение Армпатента №341, Ереван, Республика Армения, 1997.
9. Симосян М.А., Табачникова С.И., Громов Л.А. Нейрохимия, 3, 124-129, 1984.
10. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Бабаян М.А., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLIII, 13-18, 2003.
11. Bashkatova V., Nakevich V., Vitskova G., Vanin A. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 27, 487-493, 2003.
12. Batot G., Pacllet M.H., Doussiere T. Biochim. Biophys. Acta, 1406, 188-202, 1998.
13. Kovacs R., Schuchmann S., Gabriel S. et.al. J. Neurophysiol., 88, 2909-2918, 2002.
14. Shimizu N., Kobayashi K., Hayashi K. J. Biol. Chem., 289, 4414-4419, 1984.
15. Yamamoto H.A., Mohanan P.V. Toxicology, 179, 29-36, 2002.

Поступила 07.VI.2004