

Биол. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 577.616.612.152

УРОВЕНЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ КРОВИ КРЫС ПРИ ИНКУБИРОВАНИИ КРОВИ С ИОНАМИ МОЛИБДЕНА И КАДМИЯ *IN VITRO*

Մ.Տ. ՏԻՐԱԿԱՅԱՆ, Գ.Մ. ՏԻՄՈՆՅԱՆ, Տ.Տ. ԱԼԵԿՏԱՅԱՆ,
Բ.Մ. ՏԻՄՈՆՅԱՆ, Մ.Ա. ՏԻՄՈՆՅԱՆ

Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

Повышенные дозы ионов Mo^{6+} и Cd^{2+} после двух- и шестидневного инкубирования крови приводят к характерным количественным и качественным изменениям МАА и МПА. Механизмы окислительного повреждения крови крыс существенно не отличаются по направленности этих изменений. Однако они отличаются по глубине, особенно на конечных этапах инкубирования и под влиянием ионов кадмия, на фоне истощения адаптационной системы крови и снижения уровня синтезированных цит b558 сыворотки, как более толерантных метаболитов против перекиси водорода.

Mo^{6+} և Cd^{2+} իոնների բարձր դոզաներով աճների արյան հետ 2 և 6-օր տևողությամբ ինկուբացումը բերում է արյան հակա և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների որակական և քանակական բնութագրական փոփոխությունների: Վերջիններով պայմանավորված առնետի արյան օքսիդատիվ վնասման մեխանիզմներն իրենց բնույթով չապես չեն տարբերվում: Սակայն դրանք տարբերվում են այդ փոփոխությունների խորությամբ: հատկապես Cd^{2+} -ի ներկայությամբ արյան ինկուբացման վերջնական փուլերում, արյան հարմարվողական համակարգի հյուսման և սինթեզված չիճովային ցիտ b558-երի մակարդակի նվազման ֆոնի վրա, որպես H_2O_2 -ի նկատմամբ ավելի դիմացկուն մետաբոլիտներ:

The high doses of Mo^{6+} and Cd^{2+} ions lead to the characteristic quantitative and qualitative changes of the anti- and prooxidative activity metalloproteins after the 2 and 6 day's incubation with rat's blood. The oxidative damage mechanisms of blood conditioned by these changes are not differed by the change trend. However these changes are sharply differed by its depth, which are higher under the influence of Cd^{2+} . The decrease of the influence of blood adaptive systems and the level of synthesized serum cytochrome b558s, as a more tolerance metabolite against hydrogen peroxide take place, particularly in the presence of Cd^{2+} .

Кровь - молибден - кадмий - окислительное повреждение

Механизмы токсического воздействия ионов кадмия (Cd^{2+}) связываются с индуцированием апоптоза и некроза клеток G2 гепатомы [3], мионуклеарных клеток крови человека [6], тимоцитов [7] и гепатоцитов мышей [8], U937 лимфатических клеток [10] и клеток иммунной системы [14]. При этом происходит снижение уровня липопротеинов высокой плотности сыворотки крови у крыс [12]. Ионы кадмия в основном проникают на поверхностные образования эритроцитарных мембран (ЭМ), изменяя структуру бислоя фосфолипидов [13] и снижая активность антиоксидантной

системы (СОД, каталаза) [15]. У мышей кадмиевая интоксикация вызывает стимулирование продуцирования активных форм кислорода (АФК) макрофагами, приводя к снижению активности антирадикальной защитной системы, повышению высвобождения арахидоновой кислоты, уровня нитрокислородного радикала, липидной перекиссации, простагландина E_2 , NO-синтазы и циклооксигеназы-2 и тем самым создавая условия для интенсификации воспалительных процессов [5]. Интоксикация ионами кадмия вызывает также повышение уровня сульфогемоглобина и метгемоглобина и снижение уровня каталазы, церулоплазмينا и трансферрина, нарушая этим кислородный гомеостаз на фоне соответственной гипоксии [9]. Под воздействием токсических доз ионов молибдена (Mo^{VI}) происходит стимулирование процесса окисления НАДН супероксидными радикалами и ингибирование активности церулоплазмينا и других оксидаз [4]. Ионы Mo^{VI} и Cd^{II} вызывают и характерные сдвиги уровня металлопротеинов (МП) в крови быка и человека анти- и прооксидантной активности [2]. Причем, по предварительным результатам, эти изменения в крови быка существенно отличаются от таковых у человека. Для определения механизмов токсического воздействия ионов молибдена и кадмия на металлопротеины крови крыс (включая и новые типы МП прооксидантной активности) необходимо определить непосредственное воздействие этих ионов на кровь путем их инкубирования на различные сроки.

Цель настоящего исследования состояла в определении характерных количественных и качественных изменений МП антиоксидантной активности (МАО) и МП прооксидантной активности (МПА) [2] крови крыс под непосредственным воздействием токсических доз ионов молибдена и кадмия в аэробных условиях *in vitro*.

Материал и методика. МАО (Cu, Zn-СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин - ЦП и трансферрин - ТФ - из сыворотки крови) и МПА (изоформы цитохрома b558 - цитохром b558I и цитохром b558II - из сыворотки крови, цитохромы b558III, b558III, b558IV, цитохром b558 нейтрального характера из эритроцитарных мембран, супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки - супрол и цитохром b5 - из растворимой фракции эритроцитов) получали из крови крыс биотехнологическим способом, избегая использования детергента для солюбилизации белков из ЭМ [2].

К трем пробам (по 40 мкл) крови добавляли молибдат натрия и сульфат кадмия (концентрация соли в реакционной смеси - 20 мМ). В качестве контроля брали показатели крови без добавления солей, далее кровь инкубировали в аэробных условиях в течение 48 ч при 4° и проводили выделение и очистку из проб (по 20 мкл) крови МАО и МПА (другую половину проб крови продолжали инкубировать еще в течение четырех дней). При этом пробы очищенных ЭМ (по 20 мкл, смешанные с 0,04 М калий-фосфатным буфером, pH 7,4) отделяли для определения O_2 -продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-постанавливающей активности цит b558III в гетерогенной фазе [2]. Количество полученных МП определяли измерением плотности максимального оптического поглощения, характерного для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b 558 сыворотки и ЭМ - 530, супрола - 430, ЦП - 610 и ТФ - 470 нм (голоформа).

Супероксиддисмутазную активность фермента и O_2 -продуцирующую активность супрола и цит b558III определяли нитротетразолиевым способом путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола и цит b558III) образования формазана (при 560 нм). За единицу активности СОД принимали то количество фермента, которое вызывает 50%-ное ингибирование образования формазана при

восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- - продуцирующей активности супрола или цит b558III принимали то количество белка, которое способно стимулировать образование формазана на 50%.

Каталазную активность фермента определяли перманганатометрическим методом, рассчитав количество белка, расщепляющего 0,1М перекиси водорода за 1 мин при 20°.

MetHb-восстанавливающую активность цит b558III определяли *in vitro*, используя свежеполученный метHb крови крыс. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метHb составляла 0,9, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558III (при 530 нм) в реакционной смеси составляла 0,02. Непосредственно в кварцевых кюветках спектрофотометра к 2,5 мл раствора метHb добавляли 0,2 мл цит b558III или 0,2 мл ЭМ, смешанных с 0,04 М калий фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4. После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в покое в аэробных условиях *in vitro* в течение 6-8 ч при 30°. Затем была определена кинетика восстановления метHb до ферроHb путем измерения интенсивности плотности альфа-поглощения метHb (она снижается). Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм. МП из другой половины крови (по 20 мл) получали после их 6 - дневного инкубирования в аналогичных условиях.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Spectord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

Результаты и обсуждение. В зависимости от продолжительности инкубирования крови крыс с ионами молибдена и кадмия в аэробных условиях количество и активность МЛЛ и МПА претерпевают коренные и порою противоположные изменения (табл.1). Происходят не только количественные, но и качественные изменения этих МП, особенно под воздействием ионов кадмия на кровь. При 2-дневном инкубировании крови с ионами молибдена на фоне снижения уровня цитохрома (цит) b5 (переносчика электрона в метHb-редуктазной системе эритроцитов) происходит небольшое повышение суммарного уровня цит b558 ЭМ (цит b558III, цит b558IV и нейтрального характера цит b558). На этом фоне уровень ключевого НАДРН-зависимого супероксид-продуцирующего гемопротейна ЭМ - цит b558III снижен. Это снижение связано с тем, что под воздействием ионов молибдена происходят качественные изменения цит b558III с превращением его в высококислый (цит b'558III) и нейтральный цит b558 (табл.3). Наблюдается повышение супероксид-продуцирующей активности цит b558III, особенно в гомогенной фазе. Видимо, проникновение ионов Mo в ЭМ так или иначе ингибирует этот процесс. Изменение метHb-восстанавливающей активности цит b558III в гомогенной и гетерогенной фазах (в ЭМ) также имеет аналогичную направленность, и эта активность снижается в гетерогенной фазе (возможно, также из-за проникновения ионов Mo в ЭМ). Уровень сывороточных цит b558 (суммарная фракция цитохрома b558I и b558II) при двухдневном инкубировании крови заметно повышается под воздействием ионов молибдена и особенно кадмия. Однако при шестидневном инкубировании крови уровень продуцированных (синтезированных) сывороточных цит b558 снижается в присутствии кадмия (табл.3). Эти изменения, с одной стороны, могут быть связаны с увеличением уровня АФК, в первую очередь перекиси водорода и, с другой, с ослаблением

(истощением) адаптационных защитных систем крови, ответственных за синтез этих сывороточных гемопротеинов [1], снижающих повреждающие эффекты перекиси водорода. При этом продуцируемые сывороточные цит b558 претерпевают не только количественные, но и качественные изменения. Это выражается снижением величины оптического спектрального индекса (A_{558}/A_{581}) на $13,5 \pm 1,4$ % под воздействием молибдена и на $42,3 \pm 3,4$ % под воздействием ионов кадмия. Изменения плотности максимального оптического поглощения изоформ цит b558 сыворотки крови и ЭМ при двух- и шестидневном инкубировании крови с ионами Mo^{+6} существенно отличаются от таковых при воздействии ионами кадмия (табл.2).

Таблица 1. Относительные изменения (%) уровня и активности МАА и МПА крови крыс после двухдневного инкубирования крови с ионами молибдена и кадмия (20 мМ) по сравнению с 100%-ными контрольными показателями ($p < 0,05$, $n = 8$)

МПА, активность	Инкубирование с Mo^{+6}	Инкубирование с Cd^{+2}
Цит b5	-27,3±4,1	-59,2±7,0
Сумма цит b558III	+2,3±0,2	+91,3±5,1
Цит 558III	-24,3±1,7	-60,2±3,4
O_2 -продуц. активн. цит b558III в гомогенной фазе	+15,7±2,1	+8,3±0,6
O_2 -продуц. активн. цит b558III в гетерогенной фазе	+5,2±0,8	+9,4±1,1
MetHb-восстанавл. активн. цит b558III в гомогенной фазе	+31,3±2,1	+49,7±3,4
MetHb-восстанавл. активн. цит b558III в гетерогенной фазе	+22,5±1,9	+26,9±3,1
Сумма цит b558I+цит b558II (инкубация 2 дня)	+48,1±3,9	+144,4±23,5
Сумма цит b558I + цит b558II (инкубация 6 дней)	-35,5±2,9	-74,2±5,1
Цит 558IV	+104,5±9,3	-63,7±4,1
Супрол	-29,3±3,1	-54,9±3,7
O_2 -продуц. активн. супрола	+25,2±2,4	+17,2±3,0
ЦП	-19,2±2,7	-58,6±4,7
ГФ	+20,5±2,1	-67,5±3,0
СОД	-21,4±2,3	-12,8±1,9
Каталаза	+12,0±1,4	+37,0±3,2

Можно констатировать, что продуцирование (синтез) сывороточных цитохрома b558 является естественным физиологическим процессом, а не продуктом расщепления каких-то биосистем (расщепление усиливается под воздействием ионов кадмия), и этот синтез подавляется особенно ионами кадмия, что может считаться новым механизмом оксидативного повреждения крови (сыворотки) при молибденовой интоксикации. Направленность изменений уровня цит b5, суммарной фракции цит b558III ЭМ, цит b558III

его НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метНв-восстанавливающей активности, а также супрола и его супероксид-продуцирующей активности, особенно нейтрального характера цит b558 ЭМ, при кадмиевой интоксикации крови крыс сохраняется, но в большей степени (табл. 2). При шестидневном инкубировании крови крыс наблюдается почти полная дегградация белка острой фазы - ЦП, каталазы и Cu, Zn-SOD, а уровень ТФ снижается на $40,8 \pm 2,4\%$ под воздействием Mo и $70,4 \pm 5,3$ - под воздействием ионов кадмия. На этом фоне происходит снижение уровня супрола с увеличением его супероксид-продуцирующей активности и повышением степени агрегации эритроцитов. Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными [5-8]. Фактически из исследуемых МАА и МПА только ТФ и особенно сывороточные цит b558 оказывают сравнительно высокую толерантность против токсических доз ионов молибдена и кадмия.

Таблица 2. Интенсивность плотности максимального оптического поглощения изоформ цит b558 сыворотки крови и ЭМ после двухдневного и шестидневного инкубирования крови крыс с ионами Mo^{+6} и Cd^{+2} (20 мМ), $p < 0,05$, $n=8$

Пробы крови	A570				
	Суммарная фракция цитохромов b558III (после KM-52)	цит b558III	Сумма нейтрал цит b558 и цит b'558III	Сумма цит b558I + цит b558II	
				2-дневн. инкуб.	6-дневн. инкуб.
Контроль	$1,31 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,06$	$0,027 \pm 0,008$	$0,31 \pm 0,02$
Инкубация с Mo^{+6}	$1,34 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,003$	$0,24 \pm 0,002$
Инкубация с Cd^{+2}	$+2,49 \pm 0,004$	$0,26 \pm 0,004$	$2,23 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,004$	$0,08 \pm 0,002$

Приведенные изменения МАА и МПА вызывают соответственное отклонение антиоксидантного статуса - АС (расчетный суммарный уровень МАА) и прооксидантного статуса - ПС (расчетный суммарный уровень МПА) сыворотки крови и эритроцитов при двухдневном инкубировании крови крыс с ионами Mo и Cd (табл.3). Под воздействием ионов Mo АС сыворотки крови и эритроцитов изменяется незначительно, однако ПС существенно повышается в эритроцитах. Под воздействием ионов кадмия при двухдневном инкубировании крови АС в эритроцитах повышается, а ПС повышается в сыворотке крови. Эти изменения создают соответственный фон оксидативного повреждения крови крыс, особенно под воздействием ионов кадмия. Фактически механизмы деградирующего воздействия ионов Mo и Cd при 2- и 6-дневном инкубировании с кровью по характеру и направленности в основном сближаются, однако глубина этих изменений существенна под воздействием ионов кадмия. При этом на начальных этапах инкубирования адаптационные системы крови еще в силах создавать соответственные защитные системы (в частности, сывороточные цит b558), однако при

продолжении инкубирования с этими металлами наблюдается ослабление (истощение) этих систем, особенно под воздействием ионов кадмия.

Таблица 3. Относительные изменения (%) АС и ПС сыворотки крови крыс и эритроцитов после двухдневного инкубирования крови с ионами Mo и Cd (20 мМ) по сравнению с 100%-ными контрольными показателями (p<0,05, n=8)

Компоненты крови	+ Mo ⁶⁺		+ Cd ²⁺	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	+9,3±0,7	+19,8±1,3	-15,8±1,3	+90,3±5,7
Эритроциты	-9,4±1,2	+53,9±4,4	+ 24,2±2,6	-42,2±3,1

Таким образом, механизмы оксидативного повреждения крови крыс, обусловленного характерными количественными и качественными изменениями МАА и МПА после двух- и шестидневного инкубирования крови с повышенными дозами ионов Mo⁶⁺ и Cd²⁺ существенно не отличаются по направленности этих изменений. Однако они отличаются по глубине этих изменений, особенно на конечных этапах инкубирования и под влиянием ионов кадмия, на фоне истощения адаптационной системы крови и снижения уровня синтезированных цит b558 сыворотки, как более толерантных метаболитов против перекиси водорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симолян Г.М., Симолян Р.М., Симолян М.А. Мед. наука Армении, XLV, 26-29, 2005.
2. Сиракян М.С., Симолян Г.М., Бабаян М.А., Симолян Р.М., Симолян М.А. Вестник МАНЭБ Санкт-Петербург, 10, 216-220, 2005.
3. Aydin H.H., Celik H.A., Deveci R. et al. Biol. Trace Elem., 95, 139-153, 2003.
4. Chidamburam M.V., Barnes G., Frieden E. Inorg. Biochem., 22, 231-240, 1984.
5. Darr D., Fridovich I. Arch. Biochem. Biophys., 232, 562-565, 1984.
6. De La Fuente H.D., Portales - P.D., Baranda L. Clin. Exp. Immunol., 129, 69-77, 2002.
7. Fujimaki H., Ishido M., Nohara K. Toxicol. Lett., 115, 99-105, 2000.
8. Hubechu S.S., Liu J., Kloassen C.D. Toxicol. Appl. Pharmacol., 149, 203-209, 1998.
9. Hubs'kyi Iu., Ersteinuk H.M. Ukr. Biochem. Zh., 74, 124-127, 2002.
10. Li M., Kondo T., Zhao Q.-L. J. Biol. Chem., 275, 39702-39709, 2000.
11. Ramirez D.C., Gimenez M.S. Toxicol. Lett., 145, 121-132, 2002.
12. Skoczynska A., Smolk R. Int. J. Occup. Med. Environ. Health, 7, 263-271, 1994.
13. Suwalsky M., Villena F., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C. J. Inorg. Biochem., 98, 1061-1066, 2004.
14. Tsangaris G.T., Tzortzou - S.F. Toxicology, 128, 143-150, 1998.
15. Uchida M., Teranishi H., Aoshima K. et al. Toxicol. Lett., 151, 451-457, 2004.

Поступила 21.XII 2005