Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա, Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении, Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia, Biological Journal of Armenia

Биолог. журн. Армении, 3-4 (58), 2006

УДК 577.616.152

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Mo И Cd НА O_2^--ПРОДУЦИРУЮЩУЮ И МЕТГЕМОГЛОБИН-ВОССТАНАВЛИВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ НОВОЙ ИЗОФОРМЫ ЦИТОХРОМА b558 ИЗ МЕМБРАН КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ *IN VITRO*

М.С. СИРАКАНЯН, Г.Р. ОКСУЗЯН, Г.М. СИМОНЯН, Р.М. СИМОНЯН, М.А. СИМОНЯН

Институт биохимии им.Г.Буниятяна НАН РА, 375014, Ереван

Из мембран клеток селезенки нами впервые получена фракция новой изоформы цит b558, имеющая большее удельное содержание, чем цит b558III эритроцитарных мембран (ЭМ) и существенно отличающаяся от цит b558III ЭМ. Механизмы токсического эффекта ионов молибдена и кадмия на селезенку связаны с деградированием цит b558 мембран клеток селезенки, в большинстве случаев с дозозависимым снижением НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активности этого гемопротеина *in vitro*.

Առաջին անգամ փայծաղի բջիջների թաղանթներից (ՓԲԹ) ստացվել է ցիտ b558-ի նոր իզոձևի ֆրակցիա, մեծ տեսակարար քանակով՝ համեմատած էրիթրոցիտների թաղանթներում տեղակայված ցիտ b558III – քանակի հետ: Այն էապես տարբերվում է ցիտ b558 III-ից: Cd^{+2} և Mo^{+6} իոնների կոնցենտրացիաներից կախված տոքսիկ ազդեցության մեխանիզմները առնետների փայծաղի վրա առնչվում են հենց ՓԲԹ- ստացված ցիտ b558-ի ֆրակցիայի ՆԱԴՊՀ-կախյալ սուպերօքսիդ-գոյացման և մետհեմոգլոբին վերականգնման ակտիվության կտրուկ նվազման հետ (հատկապես Cd^{+2}-ի դեպքում) *in vitro*.

For the first time a fraction of the new isoform of cytochrome (cyt) b558 is prepared from spleens' cells membranes (SCM), with the higher specific amount, than that of the cyt b558III in erythrocytes membranes (EM) and is essentially altered from cyt b558III. The concentration depending intoxication mechanisms of Cd^{+2} and Mo^{+6} ions are connected with the vigorous suppression of the NADPH-depending superoxide-producing and methemoglobin - reducing activities of the fraction of cyt b558 SCM (especially in the case of cadmium ions) *in vitro*.

Селезенка - молибден - кадмий - цитохром b558 - оксидативное повреждение

Селезенка играет важную роль в иммунной защите организма (в лимфоидных клетках селезенки образуются антитела), и иммунный ответ в этом органе существенно снижается в ходе парализующих воспалительных процессов центральной первной системы [11]. На поверхности клеток селезенки (макрофагов, лимфоцитов) имеются соответственные репеторы для стероидных гормонов, факторов пролиферации клеток [7]. Наличие лимфоцитов и макрофагов в селезенке свидетельствует о ключевой роли цитохромов типа b558 в этих клетках как кофакторов для НАДРН-зависимых оксидаз в процессе продуцирования супероксидов при фагоцитозе [7, 9, 10].

Однако в литературе отсутствуют данные о препаративном получении цитохрома (цит) b558 из мембран клеток селезенки.

По разработанному нами биотехнологическому способу [3] мы получили фракцию новой изоформы цит b558 из мембран клеток селезенки крыс [МКС]. Причем, эта фракция также обладает НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активностью, свойственной цит b558III эритроцитарных мембран (ЭМ) [2, 4]. С другой стороны, цит b558III ЭМ млекопитающих претерпевает существенные количественные и качественные изменения под влиянием ионов молибдена – Mo^{+6} и кадмия- Cd^{+2} *in vitro* [5, 6].

Целью работы являлось определение влияния ионов Mo^{+6} и Cd^{+2} на НАДРН-зависимую супероксид-продуцирующую и метHb-восстанавливающую активность фракции изоформы цит b558 из мембран клеток селезенки крыс *in vitro*.

Материал и методика. Из селезенки белых половозрелых крыс получали фракцию цит b558 путем ее гомогенизирования в 0,04 М калий фосфатном буфере, pH 7,4, центрифугирования, промывания осадка этим же буфером и солюбилизации фракции цит b558, как это показано в лицензированном способе [3]. Супероксид-продуцирующую активность фракции цит b558 МКС определяли с использованием нитротетразолиевого синего (НТС) путем вычисления процента стимулирования образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу O_2^- продуцирующей активности фракции цит b558 МКС принимали количество белка, способного стимулировать образование формазана на 50%.

МетHb-восстанавливающую активность цит b558 МКС [4] определяли, используя свежеполученный метHb (феррiHb) крови крыс. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метHb составляла 0,9, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558 МКС (при 530 нм) в реакционной смеси - 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствора метHb добавляли 0,2 мл цит b558 МКС. После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в покое в аэробных условиях *in vitro* в течение 15 - 16 ч при 30°, затем, быстро перемешав реакционную смесь, определяли кинетику восстановления метHb до ферроHb путем измерения снижения интенсивности плотности альфа-поглощения метHb в течение 1,5-2 ч. Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм.

Но 2 мл фракции цит b558 МКС (с A_{280} 0,4) инкубировали с 2, 5 и 10 мг/мл $CdSO_4$ и 2, 5 и 10 мг/мл Na_2MoO_4 в течение 24 ч при 4° в аэробных условиях *in vitro*. Затем из этих проб было взято по 0,2 мл и добавлено к соответственной реакционной смеси для определения НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метHb– восстанавливающей активности фракции цит b558 МКС.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

Результаты и обсуждение. Приведенным способом из МКС получали гемопротеиновую водорастворимую фракцию цит b558, которая имела максимальные оптические поглощения в окисленном состоянии при 560, 530, 412, 360 и 280 нм и в восстановленном - 558, 550, 418 нм. Эти данные

свидетельствуют о том, что гемопротеиновая фракция из МКС крыс в основном имеет оптические спектральные показатели, характерные для цит b558 из ЭМ крыс и является модификацией цит b558 нового типа.

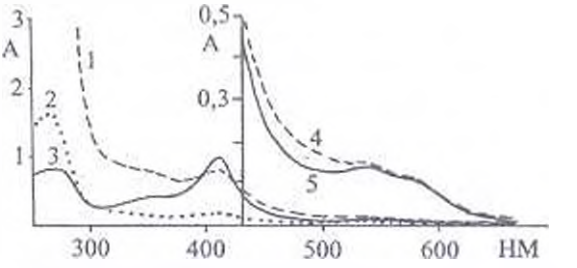

Рис.1 Оптические спектры поглощения суммарной фракции цит b558 из МКС(1,2,4) и из ЭМ крыс (3,5) после диализа и центрифугирования растворов этих гемопротеинов.

В отличие от цит b558 ЭМ (последний является белком кислого характера), фракция цит b558 из МКС имеет нейтральный характер (с изоэлектрической точкой 7). Отношение A_{412}/A_{550} у цит b558 из ЭМ эритроцитов крыс составляет 2,35, а у цит b558 из МКС – 1.4. Цит b558 из МКС имеет несравненно большее оптическое поглощение белковой части (при 280 нм), что свидетельствует о более высокой молекулярной массе этого гемопротеина, чем цит b558 из ЭМ (возможно, он является димером или тетрамером). Цит b558 из МКС также обладает НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активностью, примерно на 18-20% превышающей эту активность у цит b558 из ЭМ. Приведенным способом из 5 г селезенки крыс получается 50 мл суммарной фракции цит b558, с плотностью максимального оптического поглощения при 530 нм - 0,35, а из эритроцитарных мембран 5 мл эритроцитов крыс получается 25 мл суммарной фракции цит b558 с плотностью оптического поглощения при 530 нм – 0,25. Таким образом, удельное содержание цит b558 в мембранах клеток селезенки крыс превышает таковое в 2,4 раза у цит b558 ЭМ. Изобилие цит b558 в селезенке, действительно, свидетельствует о важной роли этого органа в иммунной системе организма, в которой цит b558 является кофактором для НАДРН-зависимых оксидаз в процессе продуцирования активных форм кислорода при фагоцитозе.

Токсические дозы Cd^{+2} и Mo^{+6} по-разному влияют на НАДРН-зависимую и МетHb-восстанавливающую активность фракции цит b558 МКС (табл.). Наблюдается дозозависимое снижение как супероксид-продуцирующей, так и метHb-восстанавливающей активности фракции цит b558 МКС. Практически полностью подавлена МетHb-восстанавливающая активность этого гемопротеина под влиянием 10 мг/мл Cd.

Одним из механизмов токсического эффекта ионов кадмия является быстрая агрегация фракции цит b558 МКС под влиянием ионов, с необратимой деструкцией этого гемопротеина. Видимо, это играет определенную роль в потере супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит b558 МКС. Ионы кадмия вызывают

оксидативное повреждение не только клеток печени, компонентов крови, но и клеток селезенки, деградируя цит b558 кофактора НАДРН-зависимых оксидаз, ответственных за продуцирование супероксидов при фагоцитозе [7-10]. Ионы молибдена, наоборот, в небольших количествах стимулируют НАДРН-зависимое продуцирование супероксидов фракцией цит b558 МКС и несколько снижают метHb-восстанавливающую активность этого гемопротеина. С другой стороны, приведенные токсические дозы Mo^{+6} не вызывают необратимую агрегацию и деградацию фракции цит b558 МКС. Снижение супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности фракции цит b558 МКС ионами кадмия может отрицательно влиять на метаболические процессы с участием супероксидов и увеличить уровень метHb, неспособного перенести молекулярный кислород к клеткам, и в целом нарушить кислородный гомеостаз. С этой точки зрения, ионы молибдена более безвредные, хотя в приведенных концентрациях они все же способны снизить метHb-восстанавливающую активность фракции цит b558 МКС.

Таблица 1. **Относительное изменение (%) НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности фракции цит b558 из МКС, по сравнению с 100% контролем (показатели в отсутствие кадмия или молибдена). P< 0,03, n= 8**

Активность	Концентрация ионов металлов, мг/мл					
	Cd^{+2}			Mo^{+6}		
	2	5	10	2	5	10
НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая	-20,3±1,7	-36,1±4,0	-51,4±3,2	+1,6±0,4	+5,3±0,3	+14,4±1,2
МетHb-восстанавливающая	-43,3±4,4	-67,5±5,0	-97,2±8,1	-2,2±0,1	-11,3±0,5	-16,7±2,4

Таким образом, из мембран клеток селезенки впервые получена фракция новой изоформы цит b558, имеющая большее удельное содержание, чем цит b558III ЭМ и существенно отличающаяся от цит b558III ЭМ, а механизмы токсического эффекта ионов молибдена и кадмия на селезенку связаны с деградированием цит b558 МКС, в большинстве с дозозависимым снижением его НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности, а продуцирование супероксидов в присутствии НАДРН и восстановление метHb являются универсальными свойствами цит b558 ЭМ и клеток селезенки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексанян Серг.С., Симонян Г.М., Алексанян С.С., Симонян М.А.* Вопр. теорет. клин. мед., 7, 25-28, 2004.
2. *Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Карапетян А.В., Симонян*

М.А. Мед.наука Армении, XLIII, 30-34, 2003.
3. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М.* Способ получения цитохромов из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. N 908 Армпатента, Ереван, 2001.
4. *Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А.* Мед.наука Армении, XLIV, 43-46, 2004
5. *Сираканян М.С., Симонян Г.М., Алексанян С.С, Симонян Р.М., Симонян М.А.* Биолог. журн. Армении, 1-2 , 61-66, 2006.
6. *Сираканян М.С., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Вестник МАНЭБ, 10, 187-191, 2005.
7. *Kotsiuruba A.V., Buchanevych O.M., Bardishev A.G. et al.* Ukr.Biochem.Z., 70, 22-32, 1998.
8. *Sumimoto H., Nozaki M., Sakaki H. et al.* Biochem.Biophys.Res.Communs., 165, 902-906, 1989.
9. *Vignais P.V.* Cell Mol.Life Sci., 59, 1428-1459, 2002
10. *Vos De A.F., van Rial D.A., van Meurs M. et al.* J.Neuroimmunol., 161, 29-39, 2005.

Поступила 27.IX.2006