

Биолог. журн. Армении, 1-2 (59), 2007

УДК 577.616.612.152

МЕХАНИЗМЫ ОКСИДАТИВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ МОЛИБДЕНА И КАДМИЯ *IN VITRO*

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

Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

В результате двухдневного инкубирования крови человека с Mo^{+6} (20 моль) *in vitro* уровень металлопротеинов антиоксидантной и прооксидантной активности заметных изменений не претерпевает, тогда как под воздействием Cd^{+2} в аналогичных условиях происходит полная их деградация с соответствующим оксидативным повреждением крови на фоне возможного ослабления метаболических процессов с участием активных форм кислорода.

Սարդու արյան և Mo^{+6} (20 մոլ) երկօրյա ինկուբացման հետևանքով *in vitro* հակաօքսիդանտային և պրօօքսիդանտային ակտիվության մետաղապրոտեինների մակարդակի նախա փոփոխություններ չեն դիտվում, այնինչ նմանատիպ պայմաններում Cd^{+2} գործնականորեն ամբողջությամբ դեգրադացնում է նշված մետաղապրոտեինները, առաջացնելով արյան օքսիդատիվ վնասում, թրվածնի ակտիվ ծների մասնակցությամբ ընթացող նյութափոխանակային գործընթացների հնարավոր քուլացման ֆոնի վրա:

The incubation of human blood with Mo^{+6} (20 mmol) during 2 days *in vitro* is not causes the essential changes of the level of antioxidative activity metalloproteins and prooxidative activity metalloproteins. However, the Cd^{+2} in analogical conditions leads to the almost full degradation of this metalloproteins, causing corresponding oxidative damage of blood, on the background of the weakening of the metabolism of reactive oxygen species.

Кровь человека - молибден - кадмий - оксидативное повреждение

Токсическое воздействие ионов Mo^{+6} на компоненты крови и других органов обусловлено многими факторами: инактивацией пероксидаз нейтрофилов (этот эффект часто используется для определения степени загрязненности окружающей среды) [13], повышением уровня Mo^{+6} в моче и крови рабочих горнодобывающей промышленности, которое вызывает оксидативное повреждение почечной ткани [11], повреждением гепатоцитов в результате связывания сульфгидрильных групп митохондрий (при этом происходит стимулирование воспалительных процессов и некоторое нарушение функции митохондрий) [14], стимулированием гибели лейкоцитарных клеток и моноцитов периферической крови, а также повреждением ДНК с повышением ее фрагментации и с усилением продуцирования супероксидных ($O_2^{\cdot-}$) и гидроксильных (HO^{\cdot}) радикалов [9], стимулированием экспрессии и секреции гена цитокинов и изменением клеточной окислительно-восстановительной активности [10].

При накоплении ионов Mo^{6+} в организме, в частности в крови, печени, почках и твердых тканях, токсический эффект Mo^{6+} обусловлен связыванием с альфа-2- макроглобулином, что повышает осмотическое давление эритроцитов и вызывает молибденозис, увеличением концентрации мочевой кислоты в крови рабочих [12] и ингибированием сульфидоксидаз с образованием тиомолибдата и эндогенных сульфидов [15]. С другой стороны, повышение доз ионов Cd^{2+} и Mo^{6+} вызывает характерное изменение анти- и прооксидантного статуса крови быка в результате ее инкубирования с этими металлами *in vitro*.

Целью настоящего исследования явилось определение характерных количественных и качественных изменений металлопротеинов (МП) антиоксидантной активности (МАО) и МП прооксидантной активности (МПА) крови человека под непосредственным воздействием токсических доз Mo^{6+} и Cd^{2+} *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 b558III и цитохром b558IV из эритроцитарных мембран, супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол и цитохром b5 из растворимой фракции эритроцитов) получали из крови человека (донорская кровь) биотехнологическим способом [8], избегая использования детергента для солюбилизации белков из эритроцитарных мембран (ЭМ) [6].

К трем пробам (по 40 мл) крови добавляли молибдат натрия и сульфат кадмия (концентрация соли в реакционной смеси составляла 20 мкмоль). В качестве контроля брали показатели крови без добавления солей. Далее кровь инкубировали в аэробных условиях в течение 48 ч при 4°. Затем проводили выделение и очистку из крови МАО и МПА. При этом пробы очищенных ЭМ (по 30 мл, смешанные с 0,04 М калий фосфатным буфером, pH 7,4) отделяли для определения степени рилизинга цитохрома (цит) b558 из ЭМ [7], а также O_2^- -продуцирующей и метгемоглобин (метHb)-восстанавливающей активности цит b558III в гетерогенной фазе [5]. Количество полученных МП определяли измерением плотности максимального оптического поглощения, характерного для цит b5 при 525 нм, для цит b 558III и цит b558 IV – 530, супрола – 430, ЦП- 610 и ТФ - 470 нм (голоформа).

Супероксиддисмутазную активность фермента и O_2^- -продуцирующую активность супрола и цит b558III определяли нитротетразолиевым синим (НТС) [4] 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 перманганометрическим методом, рассчитав количество белка, расщепляющего 0,1М перекиси водорода за 1 мин при 20°.

MetHb-восстанавливающую активность цит b558III определяли *in vitro*, используя человеческий свежеполученный метHb. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метHb составляла 0,8, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558III (при 530 нм) в реакционной смеси составляла 0,02. Непосредственно в кварцевых кюветах 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°. Далее 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. Таким образом, была определена кинетика снижения плотности альфа-полосы метHb под воздействием нативного цит b558III и после его инкубирования с молибдатом натрия и сульфатом кадмия в приведенных концентрациях (по 20 мкмоль). Затем инкубировали ЭМ с молибдатом натрия и сульфатом кадмия в приведенных концентрациях и определили метHb восстанавливающую и O_2^- -продуцирующую активность цит b558III в гетерогенной фазе (непосредственно в ЭМ).

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 (1').

Результаты и обсуждение. При действии Mo^{6+} на МПА крови человека существенно снижался эндогенный уровень цитохрома (цит) b5 в рстворимой фракции эритроцитов (табл.1). Такое снижение, видимо, компенсируется повышением уровня эритроцитарных мембранных цит b558. При этом степень отщепления (рилизинг) цит b558 из ЭМ существенно не изменяется. НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая активность цит b558III [1] практически не изменяется как в гомогенной, так и в гетерогенной фазах (в ЭМ). Однако под влиянием ионов Mo^{6+} метHb-восстанавливающая активность цит b558III несколько снижается. Mo^{6+} в приведенных условиях вызывает небольшое снижение эндогенного уровня супрола, скорее всего, путем стимулирования перекисного окисления фосфолипидных остатков самого супрола супероксидными радикалами, продуцируемыми этим липопротеином высокой плотности сыворотки [3]. Одновременно несколько повышается O_2^- -продуцирующая активность супрола.

Из МАА человеческой крови повышается только эндогенный уровень ТФ, возможно, из-за повышения степени насыщенности ионами железа, и пока трудно определить механизм воздействия Mo^{6+} на это явление. Уровень остальных МАА практически не изменяется под воздействием ионов Mo^{6+} в приведенных условиях.

Совершенно иным образом происходит изменение эндогенных уровней МАА и МПА человеческой крови при инкубировании последней с ионами кадмия (табл.1). Под влиянием последних в приведенных условиях происходит резкое снижение эндогенных уровней МПА (цит b5, цит b558 ЭМ и супрола). При этом на фоне снижения O_2^- -продуцирующей активности супрола происходит повышение НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b558III. Причем, ионы кадмия стимулируют процесс превращения (около 70%) цит b558III в цит b'558III, а цит b558IV и b'558IV. Цит b'558III и цит b'558IV являются изоформами цит b558 высококислотного и высокоосновного характера, которые практически иммобилизуются на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 соответственно и в основном отделяются от этих целлюлоз только с помощью детергента. Такое превращение цит b558III обуславливается процессом его окисления [2]. Видимо, из-за этого степень рилизинга цит b558 из ЭМ заметно снижена. Фактически ионы кадмия изменяют состав цит b558III, что отрицательно влияет на текучесть ЭМ и повышает степень агрегации цит b558III. Это явление может влиять и на гемодинамику при интоксикации ионами кадмия.

Присходит также снижение стабильности ЭМ и эритроцитов. Возможно, этому способствует увеличение супероксидпродуцирующей активности цит b558III под воздействием ионов кадмия, поскольку в результате дисмутирования супероксидов продуцируется перекись водорода, которая при накоплении деградирует в цит b558III. Накоплению этой перекиси способствует и то обстоятельство, что ионы кадмия практически полностью инактивируют каталазу (табл. 1). Под влиянием ионов кадмия фактически происходит существенное ослабление метаболических процессов крови человека. С другой стороны, резкое снижение метНв – восстанавливающей активности цит b558III может вызывать повышение доли метНв, неспособного перенести молекулярный кислород к клеткам. Таким образом, под влиянием токсических доз ионов Cd^{+2} происходит не только потеря стабильности эритроцитов, но и нарушение кислородного гомеостаза.

Таблица 1. Относительные изменения (%) уровня и активности МАА и МПА крови человека под воздействием молибдата натрия и сульфата кадмия (по 20 ммоль) по сравнению с 100% показателями крови в отсутствие этих солей *in vitro* ($P < 0,05$, $n = 10$).

Металлопротеины и активность	Mo ⁶⁺	Cd ²⁺
Цит b5	-47,3±6,2	-75,3±8,5
Суммарная фракция цит b558	+23,2±2,4	-15,4±3,2
Цит b558III	-1,3±0,1	-64,7±5,6
Цит 558IV	+33,4±1,7	-85,2±6,7
Супрол	-12,3±2,2	-86,4±7,0
O ₂ ⁻ - продуц. активность супрола	+13,3±1,1	-20,0±1,5
O ₂ ⁻ - продуц. активность цит b558III в гомоген. фазе	+2,1±0,04	+34,0±3,1
O ₂ ⁻ - продуц. активность цит b558III в гетероген. фазе (в ЭМ)	+ 6,1±0,3	+47,9±4,5
МетН - восстанавлив. активность цит b558III	-24,3±3,0	- 87,5±6,4
Степень ридантинга цит b558 из ЭМ	+2,3±0,2	-27,5±3,3
ЦП	- 2,2±0,6	- 73,4±5,1
ТФ	+24,5±2,5	-88,3±7,4
Сu, Zn-СОД	-3,1±0,04	- 69,3±7,7
Каталаза	- 4,7±0,4	-96,8±5,0

Расчетные суммарные уровни МАА и МПА (антиоксидантный и прооксидантный статусы) сыворотки крови и эритроцитов под воздействием относительно высоких доз Mo⁶⁺ существенных изменений не претерпевают (табл. 2). Однако аналогичные изменения под воздействием ионов кадмия весьма существенны, так как могут привести к оксидативному повреждению компонентов крови человека.

Таблица 2. Относительные изменения антиоксидантного статуса (АС) и прооксидантного статуса (ПС) крови человека под воздействием ионов Mo^{+6} и Cd^{+2} по сравнению с 100% контрольными показателями ($P < 0,05$, $n = 10$)

Компоненты крови	Mo^{+6}		Cd^{+2}	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка крови	-21,8±2,2	+1,4±0,1	-161,4±12,5	-106,3±12,0
Эритроциты	+1,7±0,4	-18,3±5,5	-175,1±36,5	-224,9±41,7

Таким образом, под воздействием относительно высоких доз ионов Mo^{+6} на кровь человека МАА и МПА практически не перетерпевают количественных и качественных изменений, и при этом не наблюдается изменений анти- и прооксидантного статусов крови, однако ионы Cd^{+2} вызывают нарушение указанных биохимических показателей, создавая соответственный фон оксидативного стресса крови человека *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Карапетян А.В., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLII, 30-34, 2003.
2. Симосян М.А., Галоян А.А., Симосян Г.М. Докл. НАН РА, 97, 62-66, 1997.
3. Симосян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симосян Р.М. Биохимия, 61, 932-938, 1996.
4. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Бабаян М.А., Симосян М.А. Мед. наука Армении, XLIII, 43-46, 2004.
5. Симосян Р.М., Симосян Г.М., Бабаян М.А., Симосян М.А., Галоян А.А. Мед. наука Армении, XLII, 13-18, 2003.
6. Симосян М.А., Симосян Г.М. Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван, 1997.
7. Симосян М.А., Симосян Г.М., Симосян Р.М. Лицензия изобрет. № 908 Армпатента. Ереван, 2001.
8. Сиракяни М.С., Симосян Г.М., Бабаян М.А., Симосян Р.М., Симосян М.А. Вестник – МАНЭБ Санкт-Петербурга, 10, 216-220, 2005.
9. Bagchi D., Joshi S.S., Bagchi M. et al. J.Biochem.Mol.Toxicol., 14, 33-41, 2000.
10. Dond W., Simeniva P.P., Gallucci R. et al. Toxicol.Appl.Pharmacol., 151, 359-366, 1998.
11. Garçon G., Leleu B., Zerimch F. et al. J.Occur.Environ.Med., 46, 1180-1186, 2004.
12. Lener J., Bibr B. J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol., 28, 405-419, 1984.
13. Mushtakova V.M., Fomin V.A., Rogovin V.V. Izv.Akad.Nauk.Ser.Biol., 3, 336-338, 2005.
14. Rikans L.E., Yamano T. J. Biochem. Mol. Toxicol., 14, 110-117, 2000.
15. Roshchin A.V., Lukashev A.A. J.Hyg.Epidemiol. Microbiol. Immunol., 22, 137-143, 1978.

Поступила 22.1.2007

