

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРОТЕТРАЗОЛИЕВОГО СИНЕГО СУПРОЛОМ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Р. М. СИМОНЯН

*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
доцент ГГУ, Институт биохимии имени Бунятяна НАН РА*

Супероксид-продуцирующий липопротеин высокой плотности – супрол, выделенный из сыворотки венозной крови человека, за счет NADPH в своем составе проявляет восстановительные свойства, в частности восстанавливает нитротетразолиевый синий (НТС), превращая его в формазан. Наблюдается прямолинейная зависимость между концентрацией супрола и скоростью образования формазана.

Супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки крови (супрол) в присутствии следов ионов переходных металлов продуцирует супероксидные радикалы (O_2^-) *in vitro* [1]. За счёт продуцируемых O_2^- введённый крысам супрол проявляет противоопухолевый эффект [2]. Механизм продуцирования O_2^- происходит по схеме: супрол-NADPH-Fe(+3) $\rightarrow$ супрол-NADP⁺-Fe(+2) + O_2^- $\rightarrow$ супрол-NADPH-Fe(+3) + O_2^- . Наличие NADPH в молекуле супрола из сыворотки крови показан спектрофлюориметрическим методом [1]. Фактически за счёт электрона группы NADPH наблюдается восстановление ионов железа.

С разработкой метода выделения из сыворотки крови млекопитающих нативного супрола (без активации следами ионов переходных металлов), стало возможным выявить восстановительные свойства этого супрола, в частности для восстановления НТС, как реагента в методе определения антиоксидантной активности биоактивных соединений. Решение этой задачи является целью работы.

Материал и методы. Для выделения нативного супрола из сыворотки венозной крови была использована целлюлоза DE-52 («Whatman», Англия). Были использованы НТС, феназин метасульфат (ФМС), пиродифосфат натрия из фирмы «Sigma». В ходе работ были использованы центрифуга K-70 (Германия) и спектрофотометр «Specord UV/VIS», с длиной оптического пробега 1 см, при комнатной температуре. Статистическую обработку полученных данных осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности «р», число опытов: n=6.

Результаты и обсуждение.

Выделение нативного супрола из сыворотки крови млекопитающих.

После центрифугирования крови (40 мл) при 3000 об/мин 10 мин, сыворотку отделяли и дополнительно центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин. После разбавления сыворотки водой, её пропускали через колонку с DE-52, для удаления церулоплазмينا, транцферрина и других белков антиоксидантной активности. Из элюата этой колонки фракцию нативного супрола осаждали 0,1 М уксусной кислотой. После центрифугирования в приведенных условиях осадок супрола промывали водой для полного удаления следов кислоты и других солей и подвергали лиофилизации.

Кинетические кривые восстановления НТС супролом различного количества приведены на рис.1.

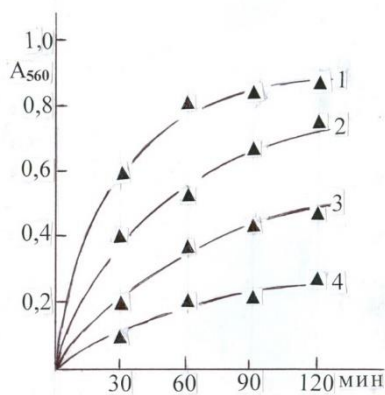


Рис.1. Кинетические кривые восстановления НТС супролом в различных количествах.

В результате инкубации НТС ($2 \cdot 10^{-4}$ М) с супролом в приведенных количествах, при 37°C наблюдается концентрационно-зависимое увеличение плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образованного в результате восстановления НТС группой NADPH в составе супрола. При этом это восстановление происходит прямолинейно в зависимости от концентрации супрола, как это показано на рис.2.

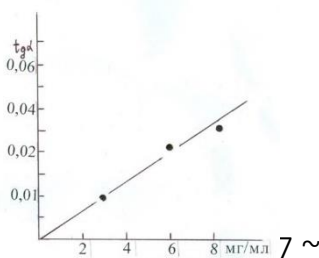


Рис.2. Скорость образования формазана ($\text{tg}\alpha$ наклона кинетических кривых восстановления НТС) при восстановлении НТС супролом в приведенных количествах.

Прямолинейное увеличение скорости ($\text{tg}\alpha$ наклона кинетических кривых) образования формазана свидетельствует об отсутствии других воздействии в этой системе. С другой стороны, исходя из того, что 1М NADPH в составе супрола стехиометрически восстанавливает 1 М НТС, легко определить количество NADPH в данном супроле, как фактора эффективности действия супрола.

Считается, что NADPH является кофактором для NADPH оксидаз (Nox), локализованного в цитазоле клеток тканей млекопитающих, как источник электронов для одноэлектронного восстановления внеклеточного молекулярного кислорода, превращая его в супероксидные радикалы для нейтрализации антигенов и это является одним из механизмов действия иммунной системы [3]. Являясь активным компонентом, группа NADPH в клетках в подавляющем большинстве находится в связанном состоянии [4]. Предполагается, что супрол, являясь NADPH содержащим агентом, может участвовать в процессе продуцирования O_2^- изоформами Nox, как источника электронов для одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода.

Ключевые слова: Супероксид-продуцирующий липопротеин высокой плотности – супрол, NADPH, супероксидные радикалы, сыворотка крови

Список использованной литературы

1. Симонян М. А., Карапетян А. В. Бабаян М. А., Симонян Р. М. , NADPH-содержащая супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови, выделение, очистка, краткие характеристики и механизм действия // Биохимия, 1996, 61(5): 932-938.
2. Синонян М. А., Карапетян А. В., Галстян Д. А., Симонян Р. М., Бабаян М. А. , Супероксид-продуцирующий липопротеин как фактор подавления роста опухолей, повышения числа лейкоцитов, ускорения деления клеток в культуре // Биохимия ,1996, 61(9): 1578-1583.
3. R. M. Smith, J. A. Connor, L. M. Chen, and B. M. Babior The cytosolic subunit p67phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase // J Clin Invest. 1996, 98(4): 977-983.
4. Blinova K., Carroll S., Bose S., Smirnov A. V., Harvey J. J., Knutson J. R., Balaban R. S. Distribution of mitochondrial NADH fluorescence lifetimes:

steady-state kinetics of matrix NADH interactions. (англ.)// Biochemistry, 2005, 44, (7): 2585-2594.

ՄԱՐԴՈՒ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ՍՈՒՊՐՈԼՈՎ ՆԻՏՐՈՏԵՏՐԱԶՈԼԱՅԻՆ ԿԱՊՈՒՅՏԻ ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՈՒՄԸ

Ռ. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, ԳԴՀ դոցենտ
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի
ինստիտուտի ավագ գիտ. աշխատող*

Մարդու երակային արյունից անջատված բարձր խտության սուպերօքսիդ արտադրող լիպոպրոտեին սուպրոլը իր կազմում գտնվող NADPH-ի հաշվին ցուցաբերում է վերականգնող հատկություն, մասնավորապես վերականգնում է նիտրոտետրազոլային կապույտը (ՆՏԿ)՝ վերածելով այն ֆորմազանի: Դիտարկվում է ուղիղ համեմատական կախվածություն սուպրոլի կոնցենտրացիայի և ֆորմազանի առաջացման արագության միջև:

NITROTETRAZOLUM BLUE REDUCTION BY SUPROL FROM HUMAN BLOOD SERUM

R. M. SIMONYAN

*PhD in Biology, GSU Assistant Professor
Senior Scientist of the H. Buniatyan Institute of Biochemistry
NAS RA, Yerevan*

Superoxide producing lipoprotein high density-suprol, isolated from human venous blood, shows reducing qualities by NADPH in its structure, in particular it reduces nitrotetrazolum blue (NTB), turning it into formazan. In the article the straight-forward dependence between suprol concentration and formazan formation rate is observed.