

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ В КРОВИ КРЫС И ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС

Р. М. СИМОНЯН

*Кандидат биологических наук,
преподаватель ГГУ*

Л. Н. АРАКЕЛЯН

*Кандидат биологических наук, доцент, профессор ГГУ,
преподаватель ГГУ*

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН РА, г.Ереван, Армения

Нормальное функционирование живых организмов невозможно без ферментов, в состав активных центров которых входит медь: Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД), церуллоплазмин (ЦП), трансферрин (ТФ), азурин и др. Изменение физиологического баланса этого металла при нарушении обменных процессов приводит к возникновению многих патологических явлений. В частности, повреждающее действие ионов меди обнаруживается деградацией ДНК [1], нарушением функций эритроцитов, приводящей к окислительному стрессу, при котором происходит стимулирование продуцирования O_2^- эритроцитарными мембранами [2] с одновременным их разрушением [3]. Дисбаланс ионов Cu^{2+} , Fe^{3+} и Zn^{2+} приводят к дегенеративным процессам в мозговой ткани, а также увеличение риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Патологические изменения происходят не только при повышении физиологического уровня меди, но и при его понижении путем уменьшения количества эндогенной меди.

При этом наблюдается окислительное повреждение эритроцитарных мембранных белков [5], понижение синтеза интерлейкина-2 в Т-лимфоцитах и повышение степени агрегации тромбоцитов [6]. В настоящее время повреждающий эффект ионов Cu в основном связывается с реакцией Фентона, в ходе которой происходит расщепление перекиси водорода под воздействием Cu^{2+} с образованием токсичного для биосистем гидроксильного радикала [7].

Однако в определенных количествах ионы меди, особенно в виде комплексов с различными соединениями (гистидиновый, пугресцин-пиридиновый), оказывают фармакологический эффект и обладают противовоспалительным, антиязвенным, антиопухолевым, антидиабетическим и радиозащитным действиями, предотвращают цитотоксический эффект перекиси водорода [8]. Данные эффекты связываются с тем, что эти комплексы меди обладают в определенной степени СОД-активностью и путем уменьшения повышенного уровня супероксидных анионов (O_2^-) предотвращают эти патологические изменения. Cu^{2+} также повышают уровень ЦП и ТФ в сыворотке крови и СОД-активность в эритроцитах, оказывая противовоспалительный эффект [9].

Имеющиеся к настоящему времени литературные данные в подавляющем большинстве подчеркивают, что под воздействием меди происходят изменения метаболизма антиоксидантных систем аэробных организмов, включая человека и животных. Однако антиоксидантные (нейтрализующие активные соединения кислорода /АСК/) и прооксидантные (продуцирующие АСК) системы, действуют одновременно и взаимосвязанно.

но. Одновременное комплексное определение характерных количественных показателей этих систем под воздействием различных концентраций ионов Cu дает обобщенное представление о молекулярных механизмах оксидативного стресса, связанного с характерными изменениями этих анти- и прооксидантных систем (металлопротеинов), регуляторов метаболизма АСК в крови в эксперименте, что является целью данной работы.

Материал и методы

Использованы белые крысы-самцы весом 200 г, которые разделены на 3 группы (по 10 животных в каждой группе): 1-ая группа - контрольная (К); 2-ая группа - животные, получившие по 0,2 г/кг CuSO_4 с питьевой водой в течение 30 дней (ОГ-1); 3-ья группа - животные, получившие по 1 г/кг CuSO_4 с питьевой водой в течение 30 дней (ОГ-2).

Животные всех групп были декапитированы под легким эфирным наркозом. Кровь животных каждой группы собирали в отдельные пробирки и стабилизировали оксалатом натрия.

Металлопротеины крови прооксидантного действия (цитохромы $b_{558}\text{I} + \text{II}$ из сыворотки крови, $b_{558}\text{III}$ и $b_{558}\text{IV}$ из мембран эритроцитов и супрол - супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки, а также цитохром b_5 из растворимой фракции эритроцитов) и металлопротеины антиоксидантного характера (ЦП, ТФ, полученные из сыворотки крови, Cu , Zn -СОД и каталазы - из растворимой фракции эритроцитов) одновременно выделяли и очищали по разработанному методу [10].

Количество полученных металлопротеинов определяли по величинам присущих каждому белку плотностей характерных максимальных оптических поглощений, которые имеются для цитохромов $b_{558}\text{I-IV}$ при 530 нм (окисленная форма), супрола при 430 нм, ЦП - 610 нм, ТФ - 490 нм. Активность СОД определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС), а каталазную активность определяли перманганатометрией [11].

Оптические спектры поглощения зарегистрированы на спектрофотометре "Specjrd M-40" (Германия). Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Под воздействием ионов меди в сравнительно высоких для биосистем концентрациях уровни эндогенных антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов (регуляторов метаболизма активного кислорода) в крови крыс изменяются разнонаправленно. В ОГ-1 по сравнению с контрольными показателями (они принимаются за 100%) уровни прооксидантных металлопротеинов несколько падают (в среднем на 11-23%), и только уровень цитохрома b_5 достоверно уменьшается. Наряду с этим эндогенные уровни антиоксидантных металлопротеинов крови в ОГ-1 понижаются больше, чем уровни прооксидантных металлопротеинов (в среднем на 27-34%). При этом, в ОГ-2 по сравнению с ОГ-1 уровни антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов в

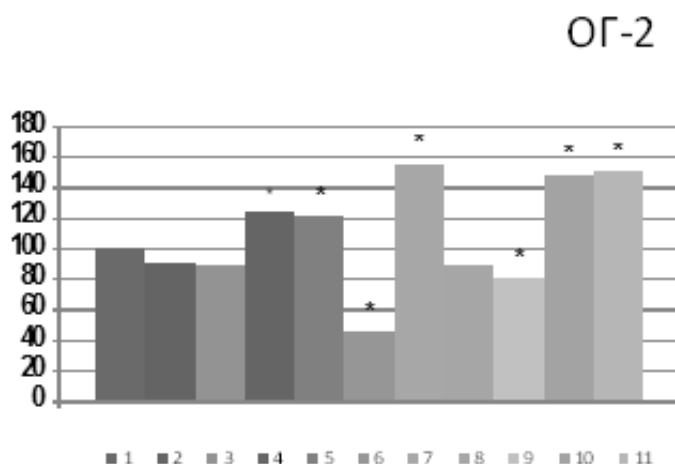
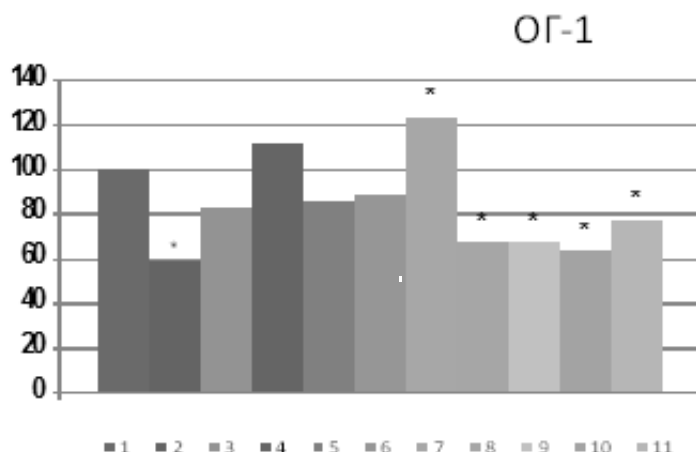
крови повышаются. Причем, если уровни сывороточных металлопротеинов (цитохромы b_5 и $b_{558}I + II$) повышаются, оставаясь ниже контроля, то уровни других металлопротеинов анти- и прооксидантного действия повышаются по сравнению с контролем (это касается и остальных эритроцитарных металлопротеинов цитохрома $b_{558}IV$, Cu, Zn -СОД и каталазы). Уровни других сывороточных антиоксидантных металлопротеинов также несколько повышены, хотя остаются ниже контрольных показателей.

Известно, что липопротеин сыворотки высокой плотности способен продуцировать O_2^- не только *in vitro*, но и *in vivo*, путем присоединения следов ионов переходных металлов меди и железа. Полученные нами результаты показали, что в ОГ-2 происходит резкое снижение уровня супрола, хотя при этом его O_2^- -продуцирующая активность увеличивается вдвое по сравнению с показателем в ОГ-1. Это возможно связано с активированием супрола ионами меди *in vivo* и увеличением процесса окисления его не только ионами Cu , но и продуцируемыми O_2^- радикалами (энергичный инициатор процесса липидной пероксидации) [12], что приводит не только к уменьшению уровня супрола, но и к потерям его стабильности и растворимости *in vitro*. Достоверные изменения уровня СОД, ЦП и ТФ в крови действительно зависят от концентрации вводимой Cu^{2+} , что также показано в других работах [13]. В ОГ-2 под влиянием Cu^{2+} происходит ощутимое повышение липидной пероксидации, против чего создается соответственный уровень антирадикальной защиты - антиоксидантных металлопротеинов, что является одним из механизмов адаптации организма.

Следовательно, под воздействием Cu^{2+} ощутимо изменяются уровни новых функционально-структурных элементов мембран эритроцитов, какими являются цитохромы $b_{558}III$ и $b_{558}IV$, которые как и другие аналогичные цитохромы b_{558} , локализованные в мембранах форменных элементов плазмы, могут быть источниками продуцирования O_2^- , что в свою очередь являются токсичными факторами для самих эритроцитарных мембран.

Использованные нами количества вводимых ионов меди, а также длительность ее орального употребления (30 дней), подобраны таким образом, чтобы так или иначе приближались к уровням ионов меди, получаемым в различных экологических зонах Армении, в зависимости от загрязнения окружающей среды.

Полученные результаты показали количественные особенности окислительного стресса, обусловленного характерным нарушением эндогенных уровней металлопротеинов, регулирующих различными механизмами метаболизм АСК в крови под воздействием различных концентраций Cu^{2+} , при повышении уровня которого организм приводит в действие системы, ответственные за синтез защитных антиоксидантных металлопротеинов.



Влияние ионов меди на уровень металлопротеинов в крови.

1 - контроль; 2 - цитохром b_5 , 3 - цитохромы b_{558} I + II; 4 - b_{558} III; 5 - цитохром b_{558} IV; 6 - супрол; 7 - O_2^- - активность супрола; 8 - ЦП; 9 - ТФ; 10 - Cu, Zn - СОД; 11 - каталаза.

1- достоверность $p < 0,05$

ЛИТЕРАТУРА

1. *F. A. Shamasi* J. Biochem Toxicol. 1996, 11: p.67.
2. *M. Scarpa, P. Viglino, D. Contri, A. Rigo* J. Biol. Chem. 1984, 259: p.10657.
3. *G. M. Rosen, M. J. Barder, E. J. Rauckman* J. Biol. Chem. 1983, 258: p.225.
4. *Y. Schmitt*, J. Trace Elem. Med. Biol. 1997, 11(4), 210-214.
5. *K. A. Sukalski*, Free Radic.Biol.Med. 1997, 22: p.835.
6. *D. G. Lominadze*, Thromb Haemost. 1996, 75: p.630.

7. *J. G. Correa, A. O. Stoppani* M. Free Radical Res. 1996, 24% p.311.
8. *Nadele A.* Biochem. Pharmacol. 1994, 43: p.555.
9. *M. C. Megahan,* Agents Actions, 1990, 31: p.59.
10. *М. А. Симосян, Г. М. Симосян, Р. В. Мелконян,* Лицензия изобретения N341. Патентное Управление РА. 1997.
11. *М. А. Симосян, Р. М. Симосян, М. А. Бабаян,* Мед. наука Арм., 2003, т.XLII, N1, с.30.
12. *Р. М. Симосян,* Автореф. канд. дис. Ереван, 2004.
13. *Р. М. Симосян, Л. Н. Аракелян, Г. М. Симосян, М. А. Бабаян, Л. П. Тер-Татевосян, Г. С. Чацлян, С. С. Александян, М. А. Симосян, С. Г. Чацлян,* Кровь, 2012, N2(14), 62.

ՄԵՏԱԴԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ՄԱԿԱՐԴԱԿԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏԻ ԱՐՅԱՆ ՄԵՋ ԵՎ ՊՐՆՁԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԱԶՂԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՅՂ ՊՐՈՑԵՍԻ ՎՐԱ

*Ռ. Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ
Լ. Ն. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ*

ՀՀ ԳԱՄ Բու՜նիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Պղնձի իոնների ազդեցության տակ փորձի առաջին խմբում, որոնք per os խմելու ջրի հետ ստացել էին 0.2 գ/կգ CuSO₄ 30 օրվա ընթացքում, դիտվում է արյան պրո-(ցիտ b₅, b₅₅₈, I, b₅₅₈ II, b₅₅₈ IV և սուպրոլ) և հակաօքսիդանտային (ցերուլոպլազմին, տրանսֆերին, ՍՕԴ և կատալազա) մետաղապրոտեինների մակարդակի իջեցում: Միարժանանա՜ տեղի է ունենում ցիտ. b₅₅₈ III-ի մակարդակի և սուպրոլի O₂- արտադրելու ակտիվության բարձրացում: Առնետների երկրորդ խմբում, որոնք ստացել էին 1 գ/կգ CuSO₄ և պահվել նույն պայմաններում, վերը նշված մետաղապրոտեինների մակարդակը մոտենում է նորմային, բացի սուպրոլից, որի մակարդակը շարունակում է իջնել: Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ կախված պղնձի իոնների կոնցենտրացիայից օրգանիզմի ադապտացիոն մեխանիզմները, որոնք պատասխանատու են մետաղապրոտեինների մակարդակի կարգավորման համար ենթարկվում են փոփոխության:

CHANGE OF METRALLPROTEINS LEVEL IN RAT BLOOD AND EFFECT OF COPPER IONS

*R. M. SIMONYAN
L. N. ARAKELYAN*

H.Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan

In the first group of experiments the rats received orally 0.2 g/kg of CuSO₄ with drinking water during 30 days. Under the effect of Cu²⁺ there was observed decrease of metalloproteins level of prooxidant (b₅, b₅₅₈I, b₅₅₈II, b₅₅₈IV and suprol) and antioxidant (ceruloplasmin, transferrin, SOD and catalase) activity. Simultaneously there takes place increase of cytochrome b558III level and O₂-producing activity of suprol. In the second group the rats were treated under the same conditions and received 1 g/kg of CuSO₄. In this case the level of the above mentioned metalloproteins was about the norm or over except suprol, the level of which continued to decrease. The obtained results suggest that depending on the copper ions concentration the mechanisms of the organism adaptation, responsible for metalloproteins level regulation, are subjected to some changes.