

БИОХИМИЯ

УДК 577.23

**Г. М. Симонян, Н. А. Серопян, М. А. Симонян,
Э. А. Качворян, академик К. Г. Карагезян**

**Получение фракции цитохрома b_{558} из мембран эритроцитов
Coregonus lavaretus sevanicus из оз. Севан
и ее оптические спектральные характеристики**

(Представлено 19/111 2001)

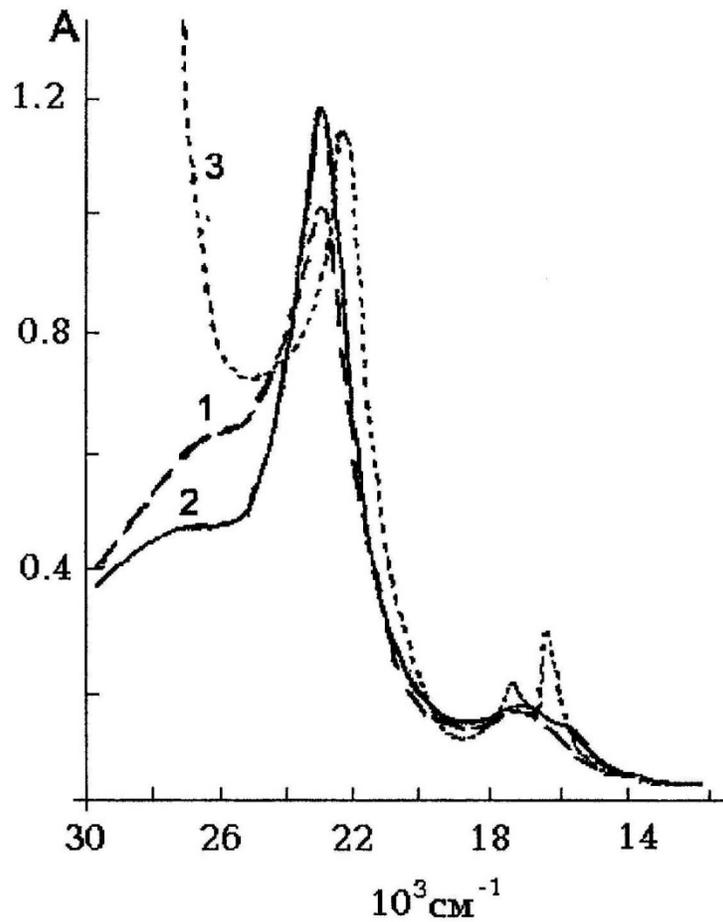
Цитохромы b_{558} различной локализации выступают в роли регуляторов метаболического продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) в мембранах форменных элементов крови, плазмы и других биосистем [1-3].

Цитохромы b_{558} новых типов, полученные из мембран эритроцитов и сыворотки крови млекопитающих [4, 5], в небольших количествах обнаружены также и в нейтрофилах рыб [6, 7]. В подавляющем большинстве эти гемопротейны солибилизируются неионными детергентами, однако в ряде случаев последние в известной степени оказывают и негативное действие, выражающееся в проявлении определенного денатурирующего влияния на изученные соединения, в частности, на цитохромы b_{558} из мембран эритроцитов. Эта денатурация значительно затрудняет очистку и проведение необходимых этапов исследования гемопротейнов. В связи с этим уместно отметить недавно разработанный способ получения цитохромов из мембран эритроцитов млекопитающих без использования детергента [8]. Это способствует получению более объективных результатов для выявления и изучения свойств и биологических функций этих гемопротейнов [9].

Настоящее исследование направлено на препаративное получение указанным способом фракции цитохрома b_{558} из мембран эритроцитов рыбы сиг *Coregonus lavaretus sevanicus* из оз. Севан и определение с помощью характерных спектральных показателей сравнительных качественных и количественных различий в цитохромах b_{558} из мембран эритроцитов крови рыб и млекопитающих.

Кровь (20 мл) брали из каудальной артерии рыб и стабилизировали 2% оксалатом натрия. Эритроциты промывали 0,9% NaCl, и после их гемолиза мембраны осаждали центрифугированием. Очищенные мембраны инкубировали в течение 5 ч при pH 8,5 при постоянном помешивании. После диализа против воды супернатант как носитель цитохрома b_{558} выделяли из

этой смеси центрифугированием. Оптические спектры поглощения с длиной оптического пути 1 см при 20° регистрировали на спектрофотометре “Specord UV-VIS” (Германия). В ходе получения фракции цитохрома b_{558} были использованы также центрифуги К-70 и К-24 (Германия).



Оптические спектры поглощения фракции цитохрома b_{558}
из мембран эритроцитов сига – 1, кошки – 2.
3 – кривая 1 после восстановления дитионитом натрия.

По предложенному нами способу из мембран, полученных из 10 мл эритроцитарной массы сига, выделяется 80 мл фракции b_{558} цитохрома с плотностью оптического поглощения, при 530 нм равной 1,2. Как показано на рисунке, характерные максимальные оптические поглощения в видимой области спектра этой фракции в основном такие же, как у цитохрома b_{558} из мембран эритроцитов млекопитающих (человек, кошка, крыса). При этом ее максимальные оптические поглощения обнаруживаются в окисленном состоянии 560 (α полоса), 530 (β), 412 (χ) и 373 нм, и в восстановленном – при 558,4, 525 и 420 нм.

Однако по оптическим спектральным показателям фракция цитохрома b_{558} сига отличается от таковой у млекопитающих по ряду показателей: 1) поглощение при 560 нм у сига оказывается слабее по сравнению с таковым у млекопитающих; 2) первый сравнительно коротковолновый характерный максимум поглощения у сига выявляется при 373 нм, в то время как у цитохромов b_{558} из мембран млекопитающих он обнаруживается при 360 нм; 3) отношение величин плотностей оптического поглощения (A_{412}/A_{360}) у сига равно 1,6, а у млекопитающих – 2,6, что является свидетельством существования некоторых различий в форме и максимумах оптического поглощения между двумя одноименными

объектами исследования, стоящими на разных филогенетических уровнях; 4) удельное содержание (плотность оптического поглощения при 530 нм фракции цитохрома b_{558} в расчете на 1 мл эритроцитов) из мембран эритроцитов сига колеблется в пределах семикратного превышения аналогичного показателя у млекопитающих. Этот факт свидетельствует о возможной структурно-функциональной роли цитохрома b_{558} в эритроцитарных мембранах сига. Учитывая, что цитохромы различных типов, локализованные в мембранах лимфоцитов, фагоцитирующих лейкоцитов и других элементов крови и тканей в целом принимают важное участие в формировании иммунологического статуса организма, и в частности, путем нейтрализации антигенов продуцирующими супероксидными радикалами [3], можно сделать предположение о функциональной причастности цитохрома b_{558} , локализованного в мембранах эритроцитов сига (и не только сига) к процессам иммунной защиты организма в роли мощного генератора супероксидного анионрадикала O_2^- . Не исключено, что благодаря именно этому у водных обитателей, в том числе и рыб, уровень иммунной защиты по сравнению с млекопитающими значительно доминирует. С другой стороны, логично допустить возможность участия цитохрома b_{558} в больших количествах в формировании определенного функционального сопряжения и комплексообразования с гемоглобином, участвующим в системе реакций переноса кислорода.

Ереванский государственный медицинский университет им. Гераци
Армянский государственный педагогический университет им. Х. Абовяна
Институт молекулярной биологии НАН РА
Институт биохимии НАН РА

**Գ. Մ. Միմոնյան, Ն. Ա. Սերոպյան, Է. Ա. Քաչվորյան,
Մ. Ա. Միմոնյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան**

Սևանա լճի *Coregonus lavaretus sevanicus* էրիթրոցիտների թաղանթներից ցիտոքրոմ b_{558} ֆրակցիայի ստացումը և օպտիկա-սպեկտրային բնութագրերը

Վերջերս մշակված եղանակով Սևանա լճի *Coregonus lavaretus sevanicus* էրիթրոցիտների թաղանթներից անջատվել է ցիտոքրոմ b_{558} ֆրակցիան և որոշվել են դրա օպտիկական սպեկտրի բնութագրական առավելագույն կլանումները հեմոպրոտեինի օքսիդացված վիճակում (560, 530, 412 և 373 նմ) և վերականգնումից հետո (558,4, 525 և 420 նմ): Այս ցուցանիշները հիմնականում մոտ են կաթնասունների էրիթրոցիտներից ստացված b_{558} ցիտոքրոմների ցուցանիշներին: Այնուհանդերձ կաթնասունների մոտ 373 նմ կլանումը փոխարինված է 360 նմ կլանմամբ. A_{412}/A_{373} հարաբերության մեծությունը սիգի մոտ կազմում է 1,6, իսկ կաթնասունների մոտ (մարդ, կատու, առնետ)՝ 2,6, միաժամանակ սիգի մոտ b_{558} ֆրակցիայի տեսակարար քանակությունը կաթնասունների համեմատ գերազանցում է 7 անգամ:

Այսպիսով, սիգի էրիթրոցիտների թաղանթներից անջատված b_{558} ցիտոքրոմի ֆրակցիան որակապես և հատկապես քանակապես տարբերվում է կաթնասունների էրիթրոցիտների թաղանթներից ստացված b_{558} ցիտոքրոմներից:

Литература

1. *Fujii H.* - FEBS Lett. 1995. V. 377. P. 345-348.
2. *Huang J., Hitt N. D. Kleinberg N. F.* - Biochemistry. 1995. Y. 34. P. 16753-16757.
3. *Kobayashi, Imajoh-Ohami S., Kuribayashi F., Ninoi A., et al.* - Biochemistry. Tokyo. 1995. V. 117. P. 758-765.
4. *Симонян М. А., Бабаян М. А., Симонян Г. М.* - Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1977-1987.
5. *Симонян М. А., Галоян А. А., Симонян Г. М., Мелконян Р. В.* - ДНАН Армении. 1997. Т. 97. № 1. С. 62-66.
6. *Shiibashi T., Iida T.* - Dev. Сотр. Immunol. 1999. V. 23. P. 213-219.
7. *Ito T., Iida T., Kawatsu H.* - Dev. Сотр. Immunol. 1998. V. 22. P. 433-437.
8. *Симонян М. А., Симонян Ф. М., Григорян Г. Г., Симонян Р. М.* - Регистрационный номер изобретения, № 20000021. Армпатент. 2001.
9. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Мелконян Р. В.* - Промышленная собственность. Официальный бюллетень Армпатента. 1997. № 1(3). С. 34.