

УДК 616.631.11.547.96

А.Р.Варданян

Влияние аллоксана на физико-химические свойства металлопротеинов крови *in vitro*

(Представлено академиком А.А. Галояном 13/III 2002)

Аллоксан в соответствующих дозах вызывает гибель инсулинпродуцирующих β -клеток в островке поджелудочной железы *in vivo*, что связывается с продуцированием во внеклеточной среде и непосредственно в β -клетках супероксидных радикалов (O_2^-) [1, 2]. Это подтверждает и воздействие профилактически введенной Cu, Zn-супероксиддисмутазы (СОД) при аллоксаниндуцированном диабете [3, 4]. Согласно свободнорадикальной теории диабетогенеза в островке β -клеток поджелудочной железы аллоксан восстанавливается до диалуриновой кислоты, и после его автоокисления образуются O_2^- и перекись водорода (как продукт ферментативного дисмутирования O_2^-) [5]. Образующаяся H_2O_2 по реакциям Габера-Вейса ($Fe^{+3} + O_2^- \rightarrow Fe^{+2} + O_2$) и Фентона ($H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow HO^\bullet + HO^- + Fe^{+3}$) является источником высокотоксичных для различных биосистем гидроксильных радикалов ($HO^\bullet$). В частности, $HO^\bullet$ нарушает синтез инсулина [6], выброс инсулина [7], метаболизм глюкозы и потребление кислорода [8]. Целью работы является определение факторов непосредственного воздействия аллоксана на физико-химические свойства ключевых металлопротеинов - регуляторов метаболизма активных форм кислорода крови *in vitro*, что позволяет расширить наши знания о молекулярных механизмах воздействия аллоксана *in vivo*.

Металлопротеины крови антиоксидантного действия: Cu,Zn-СОД, каталаза - из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) - из сыворотки крови и прооксидантного действия: цитохромы $b_{558}I$ и $b_{558}II$, супероксидпродуцирующий липопротеин - супрол из сыворотки крови и цитохромы $b_{558}III$ и $b_{558}IV$ - из мембран эритроцитов выделяли и очищали методом М.А.Симоняна и сотр. [9] с определенными изменениями, в целях исключения использования детергента как солюбилизирующего агента эритроцитарных мембранных белков [10]. В частности, отдиализованные белковые фракции сыворотки, эритроцитарных мембран и плазматической части эритроцитов подвергали ионообменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой DE-52 и КМ-52 ("Whatman", Англия) и сефадексом DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) с дальнейшим концентрированием на специальных фильтрах. В результате такой очистки получали электрофоретически гомогенные и лиофилизированные препараты указанных металлопротеинов. В опытах был использован препарат аллоксана фирмы "Sigma". Количество полученных металлопротеинов определяли по величине плотностей максимальных

оптических поглощений, характерных для цитохромов b_{558} I–IV при 530 нм (α -полоса в окисленном состоянии гемопротеинов), супрола - 430 нм (слабое поглощение), ЦП - 610 нм, ТФ - 470 нм. Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли методом нитротетразолиевого синего [11], рассчитав проценты ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами в присутствии СОД или супрола соответственно.

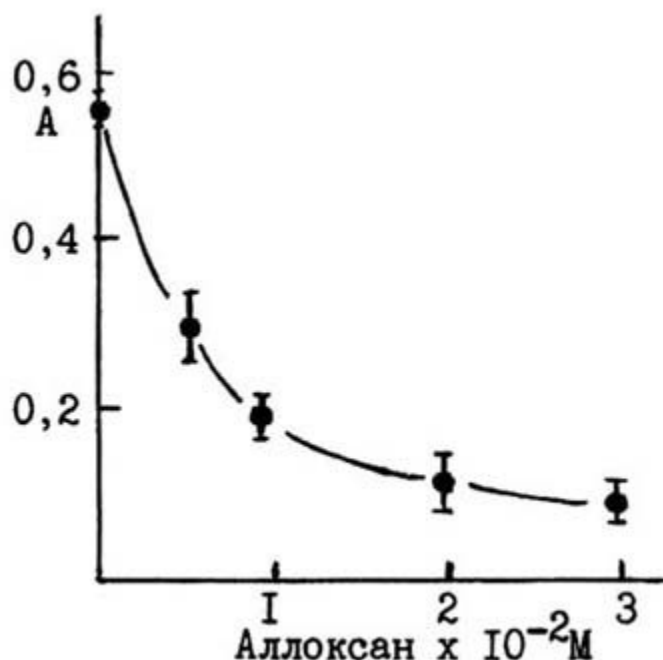


Рис.1. Интенсивность плотности максимального оптического поглощения формазана (560 нм) под воздействием аллоксана. Формазан образуется при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами, генерированными супролом (10^{-3} М) в присутствии аллоксана (время инкубирования 60 мин при 20° , рН раствора 9.0).

Каталазную активность фракций устанавливали перманганатометрическим методом, рассчитав количество расщепленной H_2O_2 (М) определенным количеством фермента за 1 мин при 20° . Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Опыт повторяли 4 раза для проверки воспроизводимости полученных результатов и для их статистической обработки методом Стьюдента - Фишера.

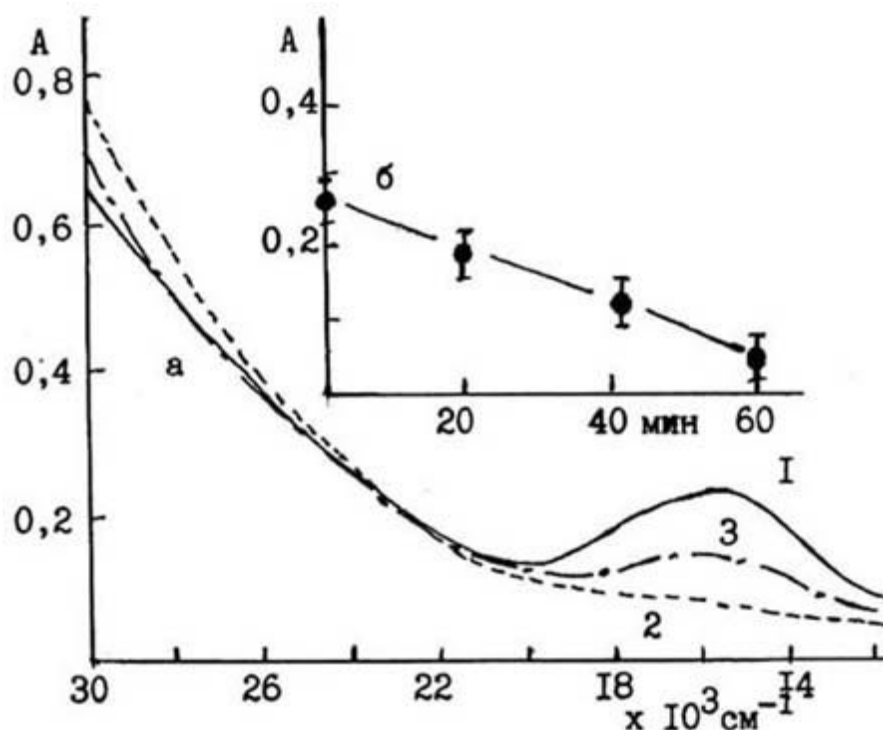


Рис.2. Воздействие аллоксана (2×10^{-2} М) на интенсивность плотности поглощения ЦП (при 610 нм) при 20° (рН раствора 7.4): а - оптические спектры ЦП в отсутствии аллоксана (1), после инкубирования в течение 2.5 ч (2). После аэрации или удаления аллоксана происходит реокисление меди в активном центре ЦП с соответственным повышением интенсивности плотности оптического поглощения при 610 нм (3); б - кинетическая кривая падения интенсивности поглощения ЦП (при 610 нм) под воздействием 2×10^{-2} М аллоксана (рН раствора 7.4).

Аллоксан повреждает инсулинпродуцирующие β -клетки *in vivo* в островке поджелудочной железы в концентрациях 50-70 мг/кг веса животного, что для одной половозрелой крысы (массой 100 г) составляет около 2×10^{-2} М [3]. Поэтому для опытов *in vitro* был использован аллоксан, концентрация которого в реакционной смеси составляла 2×10^{-2} М. Во избежание изменения рН раствора в присутствии аллоксана (аллоксан имеет слабокислый характер) белки были растворены в 0,8М калий-фосфатном буфере (рН 7,4), буферная емкость которого практически не вызвала изменения рН раствора. Аллоксан (5×10^{-3} М) вызывал подавление на 50% супероксидпродуцирующей активности супрола, полученного из сыворотки плацентарной крови человека (рис.1). Полная инактивация этого супероксидпродуцирующего липопротеина нового типа происходила под воздействием 3×10^{-2} М аллоксана, после инкубирования аллоксана с супролом (10^{-3} М) в течение 60-70 мин при 20° . Такой дезактивирующий эффект аллоксана может быть связан с окислением NADPH группы супрола в аэробных условиях [12]. Видимо этот механизм реализуется и *in vivo* при

аллоксановом диабете, при котором наблюдается падение O_2^- -продуцирующей активности супрола с соответственным повышением его эндогенного уровня (это может быть связано с подавлением процесса расщепления супрола путем липидной пероксидации супероксидными радикалами). Под воздействием аллоксана (2×10^{-2} М) при 20° в течение часа происходит почти полное восстановление $Cu(II)$ до $Cu(I)$ в активном центре ЦП, что обусловливается прямолинейным падением интенсивности плотности характерного максимального оптического поглощения при 610 нм нативного ЦП (рис. 2 а, б). Это восстановление в $70 \pm 7,1\%$ ($P < 0,05$) имеет обратимый характер (после аэрации кислородом или удаления аллоксана $30,2 \pm 4,1\%$ ($P < 0,01$) ЦП остается в восстановленном состоянии и теряет свою нативность (рис.2, а, 3). В результате этого около 30% ЦП теряет свою ферроксидазную активность. Такой эффект наблюдается в опытах *in vivo* при аллоксановом диабете [13, 14].

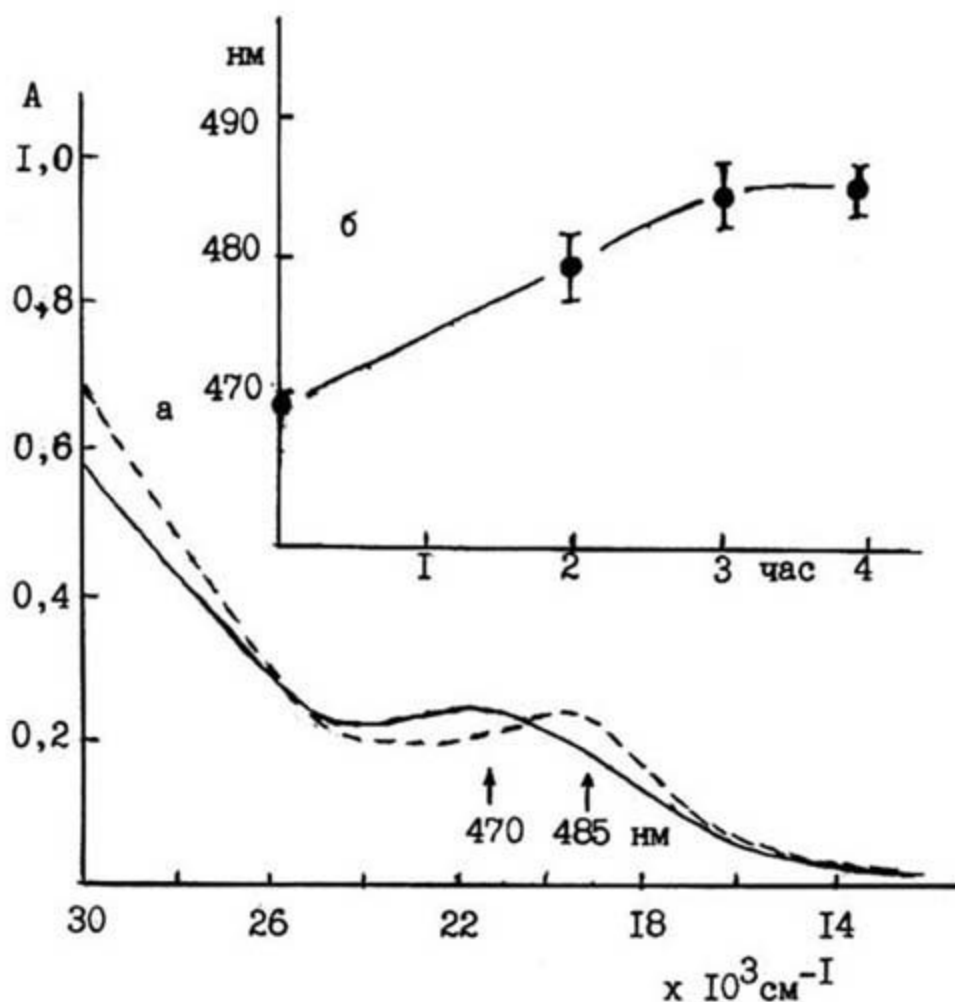


Рис. 3. Изменение максимума оптического поглощения ТФ под воздействием 2×10^{-2} М аллоксана, время инкубирования 3 ч при 20° и рН 7.4: а - оптический спектр поглощения нативного ТФ (1) и после воздействия аллоксана (2); б - кинетическая кривая изменения максимального поглощения под воздействием аллоксана в приведенных условиях.

Аллоксан приводит к смещению характерного максимального оптического поглощения ТФ от 470 нм к 485 нм (рис. 3), не изменяя плотности поглощения *in vitro* в течение 3 ч при 20°. Это явление носит необратимый характер и, видимо, действует на процесс связывания ионов Fe(II), наблюдаемый при аллоксановом диабете [15]. Аллоксан подавляет H₂O₂ расщепляющую активность каталазы на 20,2±3,3% (P < 0,05) в течение часа и практически не дезактивирует Cu,Zn-СОД при 20°, что свидетельствует о связи токсического влияния аллоксана с образованием и действием супероксидных радикалов. Аллоксан в приведенных условиях практически не вызывает каких-либо изменений форм и характерных максимумов поглощений оптических спектров как сывороточных (цитохромы b₅₅₈^I и b₅₅₈^{II}), так и мембранных эритроцитарных цитохромов b₅₅₈^{III} и b₅₅₈^{IV} [9]. Возможно эти гемопротеины новых типов приспособлены к воздействиям O₂⁻, более того, они являются, в основном, NADPH-зависимыми O₂⁻-продуцирующими системами.

Однако в экспериментах *in vivo* аллоксановый диабет в основном, обостряется в течение не 2-3 ч, а 7-10 суток. За это время защитно-адаптационные механизмы организма вырабатывают соответственный уровень супрола, ЦП, ТФ и каталазы, несколько увеличивая их. Это компенсирует понижение феррооксидазной активности ЦП, Fe-связывающей активности ТФ [13] и активности каталазы. Cu,Zn-СОД активность в крови при аллоксановом диабете снижается *in vivo* и не изменяется под воздействием аллоксана *in vitro*, что свидетельствует о повышенном расходовании СОД в процессе дисмутирования повышенных концентраций супероксидных радикалов. Напомним, что O₂⁻, наряду с H₂O₂ (последние являются продуктом ферментативного дисмутирования O₂⁻), способны инактивировать Cu,Zn-СОД [16]. Можно констатировать, что механизмы воздействия аллоксана *in vivo* и *in vitro* несколько совпадают и связаны не только с нарушением функции инсулининдуцирующих β-клеток островков поджелудочной железы *in vivo*, но и с непосредственным нарушением функций некоторых ключевых металлопротеинов (супрол, ЦП, ТФ, каталаза) в эксперименте.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыяна НАН РА
Медицинский колледж им М.Гераци, Гюмри

Литература

1. *Grankvist K., Marklund S.* - FEBS Lett. 1979. V.105. P. 15-18.
2. *Fischer L.J.* - Diabetes. 1980. V. 29. P. 213-216.
3. *Grankvist K., Marklund S.* - Nature. 1981. V. 294. P. 158-160.
4. *Симонян М.А., Геворкян Д.М., Мхитарян В.Г.* - Бюлл. эксп. биол. мед. 1987. Т. СIII. С. 306-308.
5. *Heikkila R.E., Winston B., Cohen G., Barden H.* - Biochem. Pharmac. 1976. V. 25. P. 1085-1092.

6. *Gunnarsson R.* - Molec. Pharmac. 1975. V. 11. P. 759-765.
7. *Lacy P.E., Lernmark A., Sehlin J., Taljedal I.B.* - Biochem.J. 1977. V. 162. P. 9-18.
8. *Borg H., Eide S.J., Anderson A., Hellerstrom C.* - Biochem.J. 1979. V. 182. P. 797-802.
9. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В.* - Пром. собств. (Офиц. бюлл. Армпатента). Ереван. 1997. С.34.
10. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М.* - Лицензия изобр. N 908. Армпатент. 2001. Ереван.
11. *Nishikimi M., Rao N.A., Jagik K.* - Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972. V. 46. P. 849-856.
12. *Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М.* - Биохимия. 1996. Т.61. С.932-937.
13. *Варданян А.Р., Геворкян Д.М., Агаджанов М.И., Симонян М.А.* - Мед. наука Армении. 1999. Т. 39. С.38-42.
14. *Мжельская Т.И.* - Бюлл. эксп. биол. мед. 2000. Т.130. С.124-133.
15. *Fujii H., Johonson M.K., Finnegan M.G. et.al.* - J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 12685-12694.
16. *Fridovich I.* - Annu. Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 97-112.

Հ.Ռ.Վարդանյան

Ալոքսանի փոխազդեցությունը արյան մետաղապրոտեինների ֆիզիկաքիմիական հատկությունների վրա *in vitro*

Ալոքսանը հանգեցնում է արյան որոշ հակա- և պրոօքսիդանտային ազդեցության մետաղապրոտեինների դենատուրացմանը *in vitro*: Այդ արտահայտվում է տրանսֆերինին բնորոշ օպտիկական կլանման մաքսիմումի՝ 15 նմ դեպի երկարալիք տիրույթ շեղումով, ցերուլոպլազմինի ակտիվ խումբ $Cu(II)$ -ի վերականգնումով, կատալազի և հատկապես սուպրօքսիդի ակտիվացմամբ: Նմանատիպ պայմաններում ալոքսանը չի ակտիվացրել Cu, Zn - սուպերօքսիդի սմուտագին և չի հանգեցնում պրոօքսիդանտային ազդեցության և նոր տիպի հեմոպրոտեինների (ցիտոքրոմներ $b_{558} I - IV$) օպտիկական կլանման սպեկտրների ձևափոխման:

Այսպիսով ալոքսանի վնասակար ազդեցության մեխանիզմները կապված են ոչ միայն ենթաստամոքսային գեղձի՝ ինսուլին արտադրող β -բջջերի վնասման, այլև թթվաձնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող որոշ մետաղապրոտեինների դենատուրացման հետ: