

УДК 547.96.616

Г.Р. Оксюзян

Повышение уровня антирадикальной защитной системы крови крыс с увеличением вводимых доз Hg(II)

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

При интоксикации мышей солью $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, вводимой с пищей, в почках накапливается значительно больше ртути, чем в печеночной и мозговой тканях. При этом происходит дозозависимое повышение эндогенного уровня супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатион пероксидазы в почках и печени [1]. Ртуть вызывает резкое повышение содержания активных форм кислорода (АФК) в тканях млекопитающих с увеличением активности Мп-СОД в мозговой ткани в начальных стадиях интоксикации. В то же время содержание ртути в одном грамме мозговой ткани составляет всего 0.11 мкг [2]. Эти изменения вызывают повышение оксидативного повреждения клеток тканей животных, продуцирование перекиси водорода клетками почек и др. тканей [3-5]. Однако к настоящему времени не выявлены молекулярные механизмы оксидативного повреждения крови, связанные с характерными изменениями эндогенных уровней металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия при острой интоксикации ртутью (ОИР).

Целью работы является определение количественных изменений уровней указанных металлопротеинов - регуляторов метаболизма АФК при ОИР, вызванной различными дозами соли $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$.

ОИР у половозрелых крыс-самцов (массой 230-250 г) вызывали однократным введением животным водорастворимой соли ртути в двух концентрациях: 20 мкг/кг веса животного (опытная группа 1 - ОГ-1) и 40 мкг/кг веса животного (ОГ-2). Контрольным животным в аналогичном режиме вводили тот же объем (1 мл) физиологического раствора. В каждой группе было 12 подопытных животных. Через 24 ч животных декапитировали под легким эфирным наркозом и собирали кровь по отдельности в трех сосудах с 2%-ным раствором оксалата натрия для стабилизации крови.

Металлопротеины крови антиоксидантного (МАД) и прооксидантного (МПД) действия выделяли и очищали способом [6], исключая использование детергента, который заметно снижает стабильность эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} , затрудняет их очистку и выявление физико-химических свойств и функций этих новых мембранных гемопротеинов [7]. В ходе получения и очистки металлопротеинов белковые фракции мембран эритроцитов, сыворотки и растворимой части эритроцитов подвергали диализу против воды и после центрифугирования супернатанты обрабатывали ионообменной хроматографией на целлюлозах DE-52 и KM-52 (Whatman, Англия) и сефадексе DEAE A-50 (Pharmacia, Швеция), а также гель-фильтрацией на биогелях P-100 (Reanal, Венгрия) и G-100 (Pharmacia, Швеция).

Количество полученных металлопротеинов определяли по величине присущей каждому белку плотности характерных максимальных оптических поглощений: для цитохромов

b_{558}^I , b_{558}^{II} (из сыворотки крови), b_{558}^{III} , b_{558}^{IV} (из мембран эритроцитов) - 530 нм, супероксидпродуцирующего липопротеина - супрола (из сыворотки крови) - слабое поглощение при 430 нм, церулоплазмينا (ЦП) - 610 нм, трансферрина (ТФ) - 470 нм, цитохрома b_5 (из растворимой фракции эритроцитов) - 525 нм. Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли нитротетразолиевым синим методом [8], рассчитав процент ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами (O_2^-) в присутствии СОД или супрола соответственно. Каталазную активность определяли перманганатометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (М) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°. Удельную активность приведенных ферментов определяли в расчете на 1 мл эритроцитов или сыворотки.

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В процессе получения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия) и стеклянные колонки с фильтрами различных диаметров (2х30, 4х20, 2х70 см).

Опыт повторяли 4 раза для проверки воспроизводимости полученных результатов, а статистическую обработку данных осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера.

**Изменения (%) эндогенных уровней металлопротеинов крови при ОИР,
вызванной $Hg(NO_3)_2$, по сравнению с контрольными показателями
(принимаются за 100%), $P < 0.05$, $n = 4$**

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2
Цитохром b_5	$+132.3 \pm 8.1$	$+234.5 \pm 14.7$
Сумма цитохромов b_{558}^{III} и b_{558}^{IV}	$+32.2 \pm 4.3$	$+176.8 \pm 9.5$
Сумма цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II}	-24.7 ± 3.1	-11.5 ± 2.2
Супрол	$+80.5 \pm 6.4$	$+120.7 \pm 9.1$ ($P < 0.01$)
O_2^- -продуцирующая активность супрола	$+7.5 \pm 2.0$	-32.8 ± 3.9
ЦП	-57.2 ± 4.9 ($P < 0.02$)	-28.6 ± 2.8
ТФ	-26.3 ± 1.7	-12.4 ± 1.5
СОД	$+17.5 \pm 2.4$	$+31.0 \pm 5.2$
Каталаза	$+131.7 \pm 7.5$ ($P < 0.005$)	$+244.3 \pm 15.1$ ($P < 0.02$)

Через 24 ч после ОИР уже наблюдалась гибель животных в ОГ-1 и ОГ-2 (по 3 животных). Это свидетельствует о том, что вводимые дозы ртути вызывали острую интоксикацию, с характерными отклонениями от нормы эндогенных уровней МПД и МАД в крови животных. В ОГ-1 ощутимо повышались уровни цитохрома b_5 , супрола и суммарной фракции эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} . Одновременно понижался уровень суммарной фракции сывороточных цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} (таблица). Приведенные МПД продуцируют АФК различным путем и в основном являются NADPH-зависимыми O_2^- -продуцирующими системами, локализованными, в частности, в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов и лимфоцитов [9]. Уровни МПД и МАД при ОИР изменяются неадекватно. В ОГ-1 понижение уровней ЦП и ТФ компенсируется повышением уровней каталазы и СОД. При этом O_2^- -продуцирующая активность супрола повышается незначительно. В ОГ-2 направленность изменений уровней МПД и МАД в основном сохраняется: уровни МПД продолжают повышаться, за исключением сывороточных цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} . В ОГ-2 ощутимо повышается уровень МАД (особенно активность каталазы), с соответственным повышением уровня МПД. Такое резкое повышение уровня каталазы в эритроцитах скорее всего связано с увеличением продуцирования перекиси водорода как продукта ферментативного дисмутирования супероксидных радикалов [10]. При ртутном отравлении аналогичная картина наблюдается и в других тканях [4]. Этот процесс особенно усиливается в ОГ-2, при этом отношение расчетного суммарного уровня МПД и МАД в ОГ-2 ниже, чем в ОГ-1, и составляет 3.38 и 2.22 соответственно. Понижение O_2^- -продуцирующей активности супрола в ОГ-2 свидетельствует о том, что супрол подвергался повышенной липидной перекисидации супероксидными радикалами, продуцируемыми им же самим [11]. С другой стороны, повышение уровня O_2^- и перекисей приводит к дезактивированию СОД и каталазы [12,13] с повышением их расходования при ОИР. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что повышение уровня МАД в организме является его реакцией на рост уровня АФК при увеличении доз ртути. Видимо, это происходит не в каждом организме, следствием чего является летальный исход (25%).

Таким образом, при ОИР имеют место характерные нарушения физиологического баланса между эндогенными уровнями МПД и МАД с соответственным увеличением уровня антирадикальных защитных систем в ответ на увеличение доз вводимой ртути.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

Государственный педагогический институт им М.Налбандяна, Гюмри

Литература

1. *Hussain S.A., Atkinson A., Thompson S.J., Khon A.T.* - J. Environ. Sci. Health Biol. 1999. V. 34. P. 645-660.
2. *Kumajai Y., Mizukado S., Nagafune J., Shiniashiki M., Homma-Takeda S., Shimojo N.* - Brain Res. 1997. V. 769. P. 178-182.
3. *Niwa Y.* - Rinsho Byori. 1999. V. 47. P. 189-209.
4. *Nath K.A., Croatt A.J., Likely S., Behrens T.W., Warden D.* - Kidney Int. 1996. V. 50. P. 1032-1043.
5. *Perrin-Nadif R., Dusch M., Koch C., Schmitt P., Mur J.M.* - J. Toxicol. Environ. Health. 1996. V. 48. P. 107-119.
6. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В.* - Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. Армпотента. N341. Армения. 1997.
7. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М.* - Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. Армпотента. N908. Армения. 2001.
8. *Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М.* - Биол. журн. Армении. 1999. Т.1. С.18-21.
9. *Batot G., Paclet M.H., Doussierre J., Vergnaud S., Martel C., Vignais P.V., Morel F.* - Biochem. Biophys. Acta. 1998. V.1406. P. 188-202.
10. *Fridovich I.* - Annu. Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 97-112.
11. *Girotti A.W., Thomas J.P.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V.188. P. 474-481.
12. *Lardinois O.M.* - Free Rad. Res. 1995. V. 22. P. 251-257.
13. *Hodgson E.K., Fridovich I.* - Biochemistry. 1975. V.14. P. 5294-5298.

Գ.Ռ. Օքսուզյան

Առնետների արյան հակառադիկալային պաշտպանիչ համակարգի մակարդակի բարձրացում ներարկված $Hg(II)$ -ի քանակի աճին զուգընթաց

Առնետների 20 և 40 մգ/կգ $Hg(NO_3)_2$ ներարկումով սնդիկի իոններով հարուցված սուր թունավորման հետևանքով արյան պրոօքսիդանտային և հակաօքսիդանտային գործողության մետաղապրոտեինների գումարային մակարդակների հաշվարկային հարաբերությունը համապատասխանաբար հավասար է 3.38 և 2.22: Կարելի է հաստատագրել, որ սնդիկի քանակի աճմանը զուգընթաց օրգանիզմը համապատասխանորեն ավելացնում է հակառադիկալային պաշտպանիչ համակարգի մակարդակը սուր սնդիկային թունավորման ժամանակ (էքսպերիմենտում):