

УДК 577.23

Г.М. Симонян, М.А.Симонян, Э.А.Качворян, академик К.Г.Карагезян

Получение фракции стабильного супрола из сыворотки крови рыбы сиг из оз. Севан и характеристика ее некоторых физико-химических особенностей

(Представлено 2/IX 2002)

Фракция супероксидпродуцирующего липопroteина - супрола, полученная из сыворотки крови млекопитающих (человек, бык, крыса), является НАДРН-содержащим липопroteином высокой плотности, способным продуцировать супероксидные анион-радикалы (O_2^-) in vivo и in vitro [1-3]. Его стабильность в сыворотке плацентарной крови человека выше, нежели у белых крыс, что создает определенные трудности в проведении экспериментальных исследований над этими животными. Истинная физиологическая функция супрола млекопитающих пока остается неясной, хотя уже известна его роль в холестеринтранспортирующей активности клеток [4,5]. С другой стороны, будучи энергичным O_2^- -продуциентом супрол может быть также активно действующим компонентом иммунной системы, наподобие других O_2^- -продуцирующих систем крови типа цитохромов B_{558} , локализованных в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов и лимфоцитов [6,7]. Определены характерные количественные и качественные изменения супрола как чувствительного маркера оксидативного стресса различного происхождения [8-10], в частности, как фактора сыворотки плацентарной крови человека, подавляющего рост лимфосаркомы Плисса и демонстрирующего дозозависимый стимулирующий или ингибирующий эффект в отношении пролиферации клеток куриного эмбриона in vitro [2]. Для исследования результативности действия супрола как энергичного генератора O_2^- в различных биосистемах необходимо повышать его стабильность, что пока трудно осуществимо, или пойти по пути поиска соответствующих биоисточников, из которых можно было бы выделить его в больших количествах и с достаточно высоким уровнем стабильности. В этой связи определенный интерес представляет исследование крови водных обитателей, в частности, рыб, у которых уровень O_2^- -продуцирующих биосистем (в лице цитохромов B_{558} крови) намного превышает таковой у млекопитающих [11].

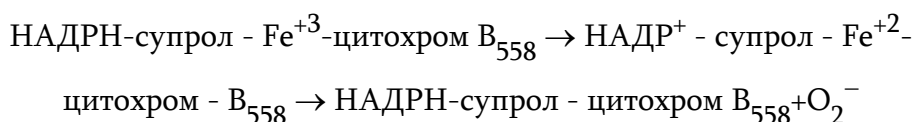
Целью работы явилось получение супрола из сыворотки крови рыбы сиг (*Coregonus lavaretus*) из оз. Севан и определение некоторых его характерных физико-химических свойств.

Кровь живых рыб забирали проколом шейной части и стабилизировали 2%-ным раствором оксалата натрия в объемном соотношении 1:5 при постоянном легком встряхивании. Выделение и очищение супрола в основном осуществляли известным методом [12], с

небольшим видоизменением с целью повышения выхода фракции супрола; были использованы метод ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 ("Whetman", Англия) и сефадексе ДЕАЕ А-50 ("Pharmacia", Швеция), а также центрифуги К-24 и К-70 (Германия) и хроматографические стеклянные колонки различных размеров (3x10, 4x20, 1x10 см). Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре "Specond UV VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Супероксидпродуцирующую активность супрола определяли с использованием нитротетразолиевого синего (НТС) с расчетом процента увеличения плотности оптического поглощения формазана (при 560 нм), образующегося при восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- -продуцирующей активности принимали количество фракции супрола, способное увеличить плотность оптического поглощения формазана при 560 нм в пределах 50%. Отделившуюся от 20 мл крови сыворотку подвергали дополнительному центрифугированию при 10000 об/мин в течение 10 мин и диализу с целью удаления следов компонентов плазмы, после чего для изоляции следов сопутствующих белков основного характера супернатант пропускали через колонку с КМ-52, уравновешенную 0.005 М калий фосфатным буфером, рН 7.4 (КФБ). Не осевшую на этой колонке фракцию, уравновешенную 0.005 М КФБ, пропускали через сефадекс ДЕАЕ А-50 для полного освобождения от следов кислых белков. Не задерживающейся на этой колонке фракцией является супрол (20 мл), с плотностью оптического поглощения при 530 нм 0.4 и с O_2^- -продуцирующей активностью 22 ед/мл фракции.

Результаты проведенных исследований (рис. 1) демонстрируют существенные различия между оптическими спектрами поглощения супрола рыбы сиг и млекопитающих. В отличие от млекопитающих [3] фракция супрола рыбы сиг, имеющая характерную для липопротеинов опалесценцию, входит в комплексное соединение с сывороточным цитохромом B_{558} [13], участвуя в продукции O_2^- без активирования следов ионов переходных металлов (Fe^{+3} , Cu^{+2}). С другой стороны, наложение спектров супрола (он имеет слабое поглощение при 430 нм) и сывороточного цитохрома B_{558} (в очищенном виде имеет поглощение при 412, 530, 560 нм [13]) приводит к определенному повышению фона поглощения спектра комплекса супрола с цитохромом B_{558} сыворотки в области волн при 400-500 нм, как это показано на рис. 1, с некоторым видоизменением спектра "чистого" цитохрома B_{558} . Скорее всего супрол рыб в элементарном акте продуцирования O_2^- использует Fe^{+3} гемовой группы цитохрома B_{558} согласно следующей схеме:



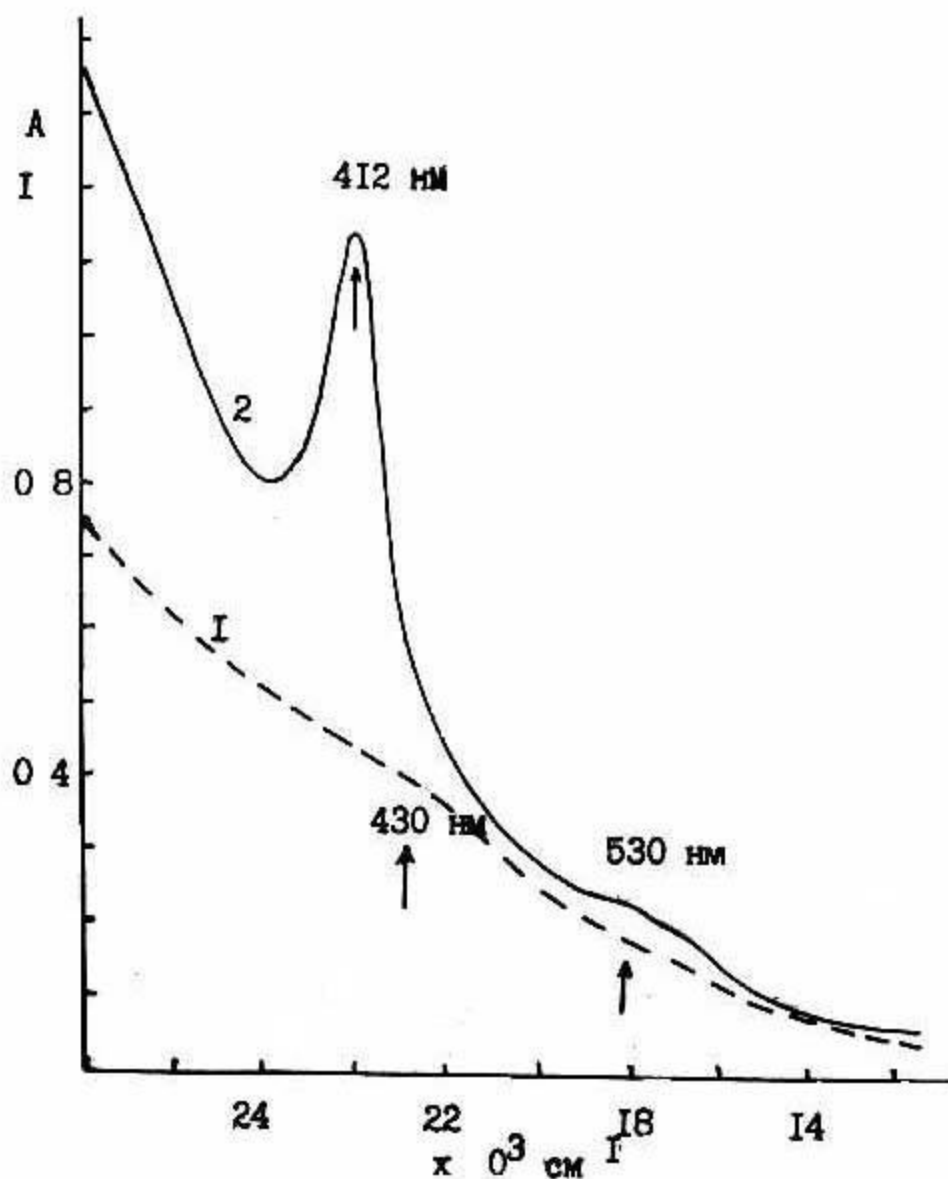


Рис. 1. Оптические спектры поглощения суперола из сыворотки плацентарной крови человека (1) и из сыворотки крови рыбы сиг (*Coregonus lavaretus*) из озера Севан (2). Фракции суперолов растворены в 0.01 М КФБ.

Известно, что цитохромы B_{558} в основном являются НАДРН-зависимыми O_2^- -продуцирующими биосистемами крови, локализованными в мембранах форменных элементов плазмы, в частности, фагоцитирующих лейкоцитов и лимфоцитов [14,15].

Таким образом, не исключена роль Fe^{+3} гемовой группы цитохрома B_{558} как переносчика

электрона от группы НАДРН супрола к молекулярному кислороду с превращением его в O_2^- . Удельное содержание супрола в 1 мл сыворотки крови рыбы сиг превышает таковую млекопитающих в 1.5-2 раза. С другой стороны, если стабильность супрола крови крыс и плацентарной крови человека сохраняется соответственно в течение 4-5 и 10-19 суток в замороженном состоянии, то супрол рыбы сиг практически сохраняет свою стабильность (растворимость без признаков самоагрегации) и O_2^- -продуцирующую активность в течение 1.5-2 месяцев. Согласно данным рис.2, количественные и качественные (спектральные) отличия супрола рыб, по-видимому, связаны не только с генетическими различиями, факторами, обусловленными давностью эволюционного развития, но и с энергичным продуцированием им O_2^- .

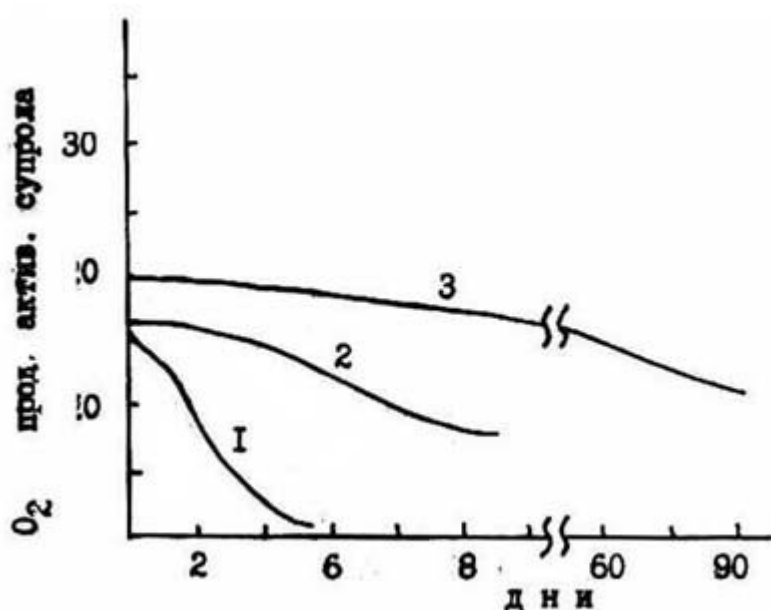


Рис. 2. Кинетические кривые изменения активности (стабильности) супрола (в отн. единицах) из сыворотки крови крыс (1), из сыворотки плацентарной крови человека (2) и из сыворотки крови рыбы сиг (*Coregonus lavaretus*) из озера Севан (3).

Таким образом, супрол рыбы сиг из оз. Севана как стабильный, энергичный и естественный источник O_2^- существенно отличается от супрола млекопитающих и, вероятно, может быть использован для подавления роста модельных экспериментальных злокачественных новообразований *in vivo*, а также для стимулирования или ингибирования процессов пролиферации клеток в культуре *in vitro* [2] и определения молекулярных механизмов воздействия O_2^- на различные биосистемы.

Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Международного научно-технического фонда проекта A676.

Литература

1. *Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М.* - Биохимия. 1996. Т.61. С.932 - 938.
2. *Симонян М.А., Карапетян А.В., Симонян Р.М., Галстян Д.А., Бабаян М.А.* - Биохимия. 1996. Т.61. С. 1578 - 1583.
3. *Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А.* - Биол. журн. Армении. 1999.Т.52. С. 18 - 21.
4. *Страйер Л.В.* В кн.: Биохимия. Т.2. М. Мир. С. 218-220.
5. *Schonfeld G., Pleger B., Roy R.* - J. Biol. Chem. 1975. V.250. P.7943-7950.
6. *Jonsson G., Harmsringdohl M.* - Free Radic. Res. Commun. 1993. V.18. P.87-98.
7. *Batot G., Paclet M.H., Doussiere J., Vergnaud S.at al.* - Biopchem. Biophys. Acta. 1998. V.1406. P. 188-202.
8. *Шакарян М.А., Карагезян К.Г., Симонян М.А., Бабоян А.С.* - Укр. биохим. журн.1997. Т.69. С.208-212.
9. *Karageuzyan K.G., Simonyan M.A., Hoveian G.A., Simonyan R. M.* - Inst.Intern. Conf. of FMF. Jerusalem. 1997. P.70.
10. *Григорян В.А., Карагезян К.Г., Симонян М.А., Бадалян М.А., Овеян Г.А., Карагезян М.К.* Укр. биохим. журн.1998. Т.70. С.101-105.
11. *Симонян Г.М., Серопян Н.А., Симонян М.А., Качворян Э.А., Карагезян К.Г.* - ДНАН Армении. 2001. Т.101. С.183-187.
12. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В.* - Промышленная собственность. Официальный бюллетень Армпатента. 1997. Т.1(3). С.34.
13. *Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М.* - Биохимия. 1995. Т.60. С.1977-1987.
14. *Condino-Neto A., Newburger P.E.* - Arch. Biochem. Biophys. 1998. V.360. P.158-164.
15. *Park H.S., Park J.W.* - Arch. Biochem. Biophys. 1998. V.360. P.165 -172.

Գ.Մ. Սիմոնյան, Մ.Ա. Սիմոնյան,
Է.Ա. Քաչվորյան, ակադեմիկոս Կ.Գ. Ղարազյոզյան

**Սուպրոլի կայուն ֆրակցիայի ստացումը Սևանի սիգ ձկան արյան շիճուկից և
նրա որոշ ֆիզիկաքիմիական առանձնահատկությունների բնութագրումը**

Սևանա լճի սիգ ձկան (*Coregonus Lavaretus*) արյան շիճուկից առաջին անգամ անջատվել է սուպերօքսիդ գոյացնող լիպոպրոտեինի՝ սուպրոլի ֆրակցիան, որը կոմպլեքսի մեջ է մտնում շիճուկային ցիտոքրոմ B_{558} -ի հետ և գոյացնում է սուպերօքսիդ ռադիկալներ՝ առանց նախնական ակտիվացման անցողիկ մետաղների իոնների հետքերով: Կաթնասունների սուպրոլի համեմատ սիգի սուպրոլը ունի բարձր տեսակարար քանակություն, ակտիվություն և կայունություն: