

УДК 577.112.546.616

Г.Р.Оксузян, М.А.Симонян, академик А.А.Галоян

Воздействие галармина на эндогенные уровни некоторых металлопротеинов крови при острой интоксикации крыс ионами тяжелых металлов

(Представлено 12/X 2002)

Интоксикация (острая и хроническая) крыс ионами тяжелых металлов вызывает нарушение антиоксидантного и прооксидантного статуса в крови и других тканях, приводя к оксидативному стрессу. Происходят сдвиги эндогенных уровней металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия - регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК) [1-5]. Для снижения губительных эффектов интоксикации тяжелыми металлами часто используются низкомолекулярные соединения экстрактов растений [6], нордигидрогуаировая кислота [7], витамин Е, аскорбиновая кислота и др. [8]. Эти вещества, в основном, снижают уровень АФК при интоксикации ионами тяжелых металлов, оказывая антистрессорный эффект. Антистрессорный эффект оказывает и пролин-богатый пептид (ПБП) галармин [9-12]. Открытие нейрострессорных цитокинов мозга, в частности пролин-богатых полипептидов, продуцируемых клетками N.Paraventricularis и N.Supraoptorus гипоталамуса [13], стало важным этапом в изучении биохимических механизмов действия этих нейропептидов-цитокинов как на иммунную систему, так и на многие окислительно-восстановительные метаболические процессы при различных проявлениях оксидативного стресса (отравление змеиным ядом [14], сердечно-легочная недостаточность [12]). Было установлено, что при явно выраженных нейродегенеративных поражениях нервных клеток мозга крыс (гиппокампа) под влиянием $AlCl_3$ ПБП не только восстанавливает выживаемость животных, но и способствует выводу Al из организма [11]. Эти данные послужили основанием для предположения о положительном воздействии галармина при отравлении тяжелыми металлами.

Относительные изменения (%) эндогенных уровней МАД и МПД и их активностей при ОИТМ под воздействием галармина (n=4, P < 0.05)

Металлопротеины	Fe^{+3}		Cu^{+2}		Pb^{+2}		Hg^{+2}	
	ОГ-1	ОГ-1'	ОГ-2	ОГ-2'	ОГ-3	ОГ-3'	ОГ-4	ОГ-3'
Цитохром b_5	100.0±8.7	95.3±6.2	25.3±2.4	27.3±3.1	55.4±4.2	50.1±3.9	+132.3±6.1	141.1±6.2
Суммарная фракция цитохрома. $b_{558}I$ и $b_{558}II$	60.0±7.1 <0.02	65.4±5.2	+5.5±0.1	Нет изм.	+15.1±2.1 P<0.03	Нет изм.	-24.3±3.1	-18.6±2.5 P<0.02
Суммарная фрак-	66.7±6.5	21.4±2.4	+24.3±2.6	Нет изм.	+51.4±4.4	+11.3±2.0	+32.2±4.3	Нет изм.

ция цитохрома. b_{558}^{III} и b_{558}^{IV}	<0.01		P<0.03+		P<0.02			
O_2^- -продуцирующая активность цитохрома b_{558}	21.3±2.1 <0.02	Нет изм.	+25.4±2.2 P<0.01	Нет изм.	Нет изм.	+5.1±0.2 P<0.01	+28.2±2.2	10.4±0.2
Супрол	11.3±11.1	141±10.0	-9.4±0.9	-11.4±1.1	+31.4±2.1	Нет изм.	+80.5±6.4	+69.4±5.8
O_2^- -продуцирующая активность супрола	10.0±2.1 <0.02	12.1±1.3	+15.2±1.9	+18.2±2.1 P<0.02	+10.1±0.5	-5.3±0.4 P<0.01	+7.5±2.0	+5.5±1.1
ЦП	100.0±7.7	39.1±5.0	+40.2±4.1	-12.3±1.2	+10.3±1.1	Нет изм.	-57.2±4.9	-12.5±0.8
ТФ	36.3±4.1	Нет изм.	Нет изм.	11.2±2.1	Нет изм.	10.5±1.1	-26.3±1.7	-19.8±1.1
Си,Zn-СОД	8.9±1.2	Нет изм.	Нет изм.	5.1±0.5	+15.4±1.3	+5.4±0.5	+17.5±2.4	+14.3±1.8
Каталаза	40.2±5.5 <0.03	15.7±2.2	-25.2±2.4 P<0.01	Нет изм.	+24.9±2.6	Нет изм.	+131.7±7.5 P<0.02	70.5±5.7 P<0.03

Целью работы является комплексное определение количественных и качественных изменений ключевых металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия в крови крыс при острой интоксикации ионами тяжелых металлов (ОИТМ) (Fe^{+3} , Cu^{+2} , Pb^{+2} и Hg^{+2}) под воздействием галармина в лечебном режиме.

Белые крысы-самцы массой 160-180 г, содержащиеся на полноценном рационе в течение 30 дней до начала эксперимента, были разделены на 8 групп (по 7 крыс в каждой). Животные 1 опытной группы (ОГ-1) получали внутрибрюшинно Fe^{+3} в виде раствора $FeCl_3$ по 50 мг/кг веса животного. Животным ОГ-1' в первый и второй день после введения Fe^{+3} вводился также внутрибрюшинно галармин по 120 мкг/кг веса животного. Аналогичным образом животные ОГ-2 получали по 150 мг/кг Cu^{+2} в виде раствора $CuSO_4$, а животные ОГ-2' наряду с Cu^{+2} получали и галармин. Животные ОГ-3 получали Pb^{+2} в виде подкисленного ацетата свинца по 100 мг/кг. Животные ОГ-3' наряду с Pb^{+2} получали и галармин. Животные ОГ-4 получали Hg^{+2} в виде раствора $HgNO_3$ (20 мг/кг). Животные ОГ-4' наряду с Hg^{+2} получали и галармин. Контрольным животным вводился физраствор в аналогичных условиях.

Кровь животных в каждой группе стабилизировали 2% оксалатом натрия. Металлопротеины крови прооксидантного действия (МПД) (цитохром b_5 из растворимой фракции эритроцитов; суммарная фракция цитохромов b_{558}^I и b_{558}^{II} из сыворотки крови, суммарная фракция цитохромов b_{558}^{III} и b_{558}^{IV} из мембран эритроцитов; супероксидпродуцирующий липопротеин - супрол из сыворотки крови) и антиоксидантного действия (МАД) (Cu ,Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов; церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) одновременно были выделены и очищены по разработанному нами способу без использования детергентов [15] для солюбилизации эритроцитарных мембранных

гемопротеинов, так как детергент ощутимо снижает стабильность цитохромов b_{558} . Отдиализованные белковые фракции сыворотки, эритроцитарных мембран и растворимой фракции эритроцитов подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52 и КМ-52 ("Whatman", Англия), сефадексе DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) с последующей гель-фильтрацией на биогеле Р-100 ("Reanal", Венгрия). Количество полученных металлопротеинов определяли по величинам плотностей максимальных оптических поглощений, характерных: для цитохромов b_{558} при 530 нм, цитохрома b_5 - 525 нм, супрола - 430 нм (или 280 нм), ЦП - 610 нм и ТФ - 470 нм. Супероксиддисмутазную активность фракций, супероксидпродуцирующую активность супрола и НАDPН-зависимую супероксидпродуцирующую активность цитохрома b_{558} III определяли методом нитротетразолиевого синего (НТС), рассчитав процент ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами в присутствии СОД, супрола и цитохрома b_{558} III соответственно. За единицу СОД-активности принимали количество фракции, способное ингибировать образование формазана на 50%. За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола или цитохрома b_{558} III принималось количество фракции, стимулировавшее образование формазана на 50%. Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим методом, рассчитав количество расщепленной H_2O_2 (М). За единицу каталазной активности принимали количество фракции, расщеплявшее 0.1 М H_2O_2 за 1 мин при 20°. Удельные активности приведенных метаболитов определяли в расчете на 1 мл эритроцитов (для Cu,Zn-СОД, каталазы и цитохрома b_{558} III) и на 1 мл сыворотки (для супрола).

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В ходе получения и очистки металлопротеинов были использованы также центрифуги К-24 и К-70 (Германия) и стеклянные колонки с фильтрами различных размеров (2×20, 4×30, 2×80 см). Для проверки воспроизводимости полученных результатов опыт повторяли четыре раза. Статистическую обработку осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера.

Обобщенная картина относительных изменений (%) эндогенных уровней металлопротеинов крови - регуляторов метаболизма АФК (по сравнению с контрольными показателями, которые принимаются за 100%) после острой интоксикации ионами тяжелых металлов (Fe^{+3} , Cu^{+2} , Pb^{+2} и Hg^{+2}) представлена в таблице. Очевидно, что эти изменения в основном происходят по-разному. ОИТМ вызывает ощутимое отклонение от нормы эндогенных уровней МПД и МАД, создавая условия соответственного оксидативного повреждения компонентов крови. Уровень цитохрома b_5 во всех группах повышался, что может являться результатом ограниченной подвижности (это неоднократно было показано при гипокинезии крыс, когда уровень цитохрома b_5 повышался в 3-4 раза). Уровень сывороточных цитохромов b_{558} повышался в ОГ-1, ОГ-1', ОГ-3, а в остальных группах не изменялся или даже снижался (ОГ-4 и ОГ-4'). В ОГ-1 организм оказался в силах создавать соответственное повышение уровня сывороточных цитохромов b_{558} , способных защитить биосистемы сыворотки от губительного воздействия

H_2O_2 . Таким образом несколько компенсируется снижение уровня каталазы в эритроцитах в ОГ-1. В действительности, в тех группах, где повышен уровень цитохромов $b_{558}\text{I}$ и $b_{558}\text{II}$, снижен уровень каталазы, и наоборот (в ОГ-2, ОГ-4). Исключение составляет ОГ-3. Вторая закономерность - повышение при интоксикации уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} в исследуемых группах независимо от металла. Более того, рост уровня цитохромов $b_{558}\text{III}$ и $b_{558}\text{IV}$ сопровождается повышением НАДФН-зависимой O_2^- - продуцирующей активности цитохрома $b_{558}\text{III}$ как нового структурно-функционального компонента мембран эритроцитов. Данный факт свидетельствует о том, что эритроцитарные мембраны претерпевают ощутимые изменения, скорее всего, из-за повышения липидной пероксидации фосфолипидных остатков мембран эритроцитов [12] и этот процесс может инициироваться продуцируемыми цитохромом $b_{558}\text{III}$ супероксидными радикалами и H_2O_2 [16]. Фактически цитохром $b_{558}\text{III}$ мембран эритроцитов претерпевает не только количественные, но и качественные изменения. Супрол также претерпевает количественные и качественные изменения. Повышение его уровня в основном сопровождается снижением O_2^- -продуцирующей активности, что связано с усилением расходования супрола путем перекисного окисления фосфолипидных остатков, в ходе которого происходит его самоактивирование *in vivo* [17]. Уровень ЦП повышается в ОГ-1, ОГ-2, ОГ-3 и снижается в ОГ-4. Это свидетельствует о том, что при интоксикации ионами ртути организм все же не в силах повысить уровень белка острой фазы - ЦП. Это может быть причиной рокового исхода (в ОГ-4 имела место гибель двух животных). ТФ изменяется почти аналогично ЦП. Уровень Cu,Zn-SOD в эритроцитах практически не изменяется при ОИТМ, за исключением ОГ-4, где наблюдается некоторый рост уровня этого ключевого фермента антиоксидантного действия. Галармин не вызывает изменения уровня цитохрома b_5 , однако приближает к норме уровни цитохромов b_{558} сыворотки крови, за исключением показателей ОГ-1'. Галармин эффективно действует на эритроцитарные мембраны, приближая уровни цитохромов b_{558} к норме во всех группах, и одновременно снижает O_2^- -продуцирующую активность цитохромов b_{558} эритроцитарных мембран, приближая к норме и уровень каталазы. Однако под влиянием галармина ощутимых изменений уровня O_2^- -продуцирующей активности супрола не происходит. Уровень же ЦП имеет тенденцию к нормализации под воздействием галармина во всех группах. Это немаловажный фактор защиты биосистем галармином. Если уровень СОД практически не изменяется под воздействием галармина, то уровень каталазы, как уже отмечалось, ощутимо приближается к норме почти во всех группах (хотя в ОГ-4' уровень каталазы остается еще заметно выше по сравнению с нормой).

Таким образом, галармин способствует стабилизации эритроцитарных мембран, регулируя уровень цитохромов b_{558} и каталазы, и оказывает некоторый регулирующий эффект на сывороточные цитохромы b_{558} и ЦП. Этим галармин "смягчает" оксидативное повреждение крови при ОИТМ, не обладая антиоксидантным воздействием *in vitro*. Молекулярные

механизмы такого воздействия, видимо, связаны с его иммуномодуляторным антистрессорным воздействием.

Галармин в описанном режиме не устраняет полностью факторы оксидативного стресса. Возможно, его использование при ОИТМ в других режимах окажется более эффективным.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

Гос. пед. институт им. М.Налбандяна, г.Гюмри

Литература

1. Оксюзян Г.Р., Алексанян С.С., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А. - Вопр. теорет. клин. мед. 1999. Т.2. N 9. С.65-68.
2. Оксюзян Г.Р., Симонян М.А., Алексанян С.А., Симонян Р.М., Бабаян М.А. - Мед. наука Армении. 2002. Т.92. N 2. С.21-26.
3. Оксюзян Г.Р., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А. - Мед. наука Армении. 2002. Т. 92. N 2. С.3-6.
4. Jones A.A., DiSilvestro R.A., Coleman M., Wagner T.L - Methabolism. 1997. V.46. N 12. P.1380-1383.
5. Panemangalore M., Bebe F.M. - Biol. Trace Elem. Res. 1996. V.55. N1-2. P.111-126.
6. Niwa Y. - Rinsho Byori. 1999. V.47. N 3. P.189-202.
7. Ansar S., Iqbal M., Athar M. - Carcinogenesis. 1999. V.20. N 4. P.599-606.
8. Parta R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. - Toxicology. 2001. V.162. P.81-88.
9. Галоян А.А. - Нейрохимия. 1998. Т.15. N 1. С.3-11
10. Априкян В.С., Галоян А.А. - Мед. наука Армении. 1999. Т.31. N 3. С.29-36.
11. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г., Симонян М.А., Галоян А.А. - Нейрохимия. 1998. Т.15. N 1. С.3-11.
12. Галоян А.А., Казарян А.П., Казарян П.А. - Нейрохимия. 2001. Т.18. N 4. С.279-286.
13. Galoyan A.A. - Neurochem.Res. 2000. V.25. N 10. P.1343-1355.
14. Galoyan A.A., Kipriyan T.K., Sarkissian J.S., Sarkissian E.J., Andreasian A.S., Chavushyan E.A. - Neurochem. Res. 2000. V.25. N 6. P.791-800.
15. Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М. - Способ получения цитохромов типа b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N 908. Армпатент. 2001.
16. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. В сб.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос. мед. ун-т им.Гераци. Ереван. 1999. С.48-51.
17. Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А. - Биол. журн. Армении. Т.52. N 1. С.18-21.

Գ.Ռ.Օքսուզյան, Մ.Ա.Սիմոնյան, ակադեմիկոս Ա.Ա.Գալոյան

**Առնետների արյան որոշ մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների
կարգավորումը գալարմինով ծանր մետաղների իոններով սուր թունավորման
ժամանակ**

Առնետներին ծանր մետաղների իոններով ($Fe^{+3}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2}$) սուր թունավորման (ԾՄՍԹ) I և II օրերում ներորոկայնային ներարկված գալարմինը (120 մկգ/կգ) հանգեցնում է էրիթրոցիտների լուծելի ֆրակցիայում տեղակայված կատալազի, էրիթրոցիտների թաղանթներում տեղակայված ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի և $b_{558}VI$ -ի գումարային ֆրակցիայի, շիճուկային ցերուլոպլազմինի էնդոգեն մակարդակների, ինչպես նաև b_{558} -ի կողմից սուպերօքսիդներ գոյացնելու ակտիվության կարգավորման: Դրա հետ մեկտեղ գալարմինը էապես չի կարգավորում արյան հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային գործողության մյուս մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակները: Նշված դրական ազդակներով հանդերձ գալարմինը ցուցաբերում է հակասթրեսային ֆունկցիա ԾՄՍԹ-ի ժամանակ: