

УДК 616.36.004.612.1.599.322

А. С. Маргарян, А. А. Симонян, М. А. Симонян, академик А. А. Аветисян

**Изменение эндогенных уровней металлопротеинов крови и печени
крыс при CCl_4 -индуцированном циррозе печени и антистрессорный
эффект α -токоферола**

(Представлено 21/XI 2003)

При циррозе печени наблюдается изменение активности окислительно-восстановительных ферментов аэробного метаболизма в крови и печени [1-5]. Повышение уровня липидной перекисидации в печени при циррозе дает основание использовать антиоксидантные системы, ингибиторы этой перекисидации, в частности α -токоферол, как эффективные антистрессорные факторы [6 - 8].

Целью работы является определение при CCl_4 -индуцированном циррозе эндогенных уровней металлопротеинов крови и печени крыс - регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК), а также липидной перекисидации в печеночной ткани под воздействием α -токоферола в лечебном режиме.

Белые половозрелые крысы (180-200 г) обоих полов были разделены на три группы (по 14 животных): контрольную (К) и две опытные (ОГ-1 и ОГ-2). Контрольные животные получали внутрибрюшинно физиологический раствор (по 1 мл) на I, IV и VII день опыта. Животные ОГ-1 получали по 1.5 мл/кг CCl_4 также на I, IV и VII день опыта. Животные ОГ-2 получали аналогичным образом CCl_4 , затем 2 мг/кг (по 1 мл) α -токоферола на IV, VII и XV день опыта. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом через 30 дней. Кровь животных стабилизировали 2% оксалатом натрия в объемном соотношении 10:1. Одновременно у них была взята печень.

Металлопротеины анти- и прооксидантного действия получали из крови ранее разработанным способом [9]. Кровь подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52, KM-52, сефадексе DEAE A-50 и гель-фильтрации на биогеле P-100, белковые фракции гемолизата сыворотки и мембран эритроцитов, с элюированием металлопротеинов калий-фосфорным буфером (КФБ) при pH 7.4 с различной молярностью, отдиализовывали против воды. Металлопротеины печеночной ткани получали биотехнологическим способом [10], с некоторым видоизменением для получения суммарной фракции Cu, Zn-СОД, Mn-СОД, каталазы и цитохрома С.

После гомогенизации печеночной ткани в 0.04 М КФБ смесь замораживали при 10^0 в течение ночи, затем размораживали и супернатант собирали центрифугированием гомогената при pH 5.6. После диализа и центрифугирования супернатант подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе KM-52 ("Whatman", Англия). Затем колонку промывали 0.01 М

КФБ и элюировали цитохром С 0.2 М КФБ. Не осевшие на колонке белки являются суммарной фракцией Cu, Zn-СОД, Mn-СОД и каталазы. Количество продукта аскорбатзависимой липидной пероксидации - малонового диальдегида (МДА) определяли методом Владимирова и сотр.[11], выражая его в нмолях на 1 г ткани (для МДА при 536 нм, с $\varphi = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Супероксиддисмутазную активность фракций определяли по нитротетразолиевому синему (НТС) тесту, путем нахождения величины плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образовавшегося после восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД-активности принимали количество фракций, вызывающее 50%-ное ингибирование образования формазана. Удельная активность СОД была определена в расчете на 1 мл эритроцитов или 1 г печеночной ткани.

O_2^- -продуцирующую активность супрола и цитохрома b-558 III также определяли НТС тестом, путем вычисления прироста плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм) под воздействием определенных количеств O_2^- -продуцирующих белков. За единицу O_2^- -продуцирующей активности принимали количество белков, вызывающее 50%-ное повышение величины плотности оптического поглощения формазана. Удельная O_2^- -продуцирующая активность супрола и цитохрома b-558 III была определена в расчете на 1 мл сыворотки или 1 мл эритроцитов соответственно.

Каталазную активность фракций определяли перманганатометрическим методом, путем вычисления количества расщепленной H_2O_2 определенным количеством фермента при 20° в течение 1 мин. За единицу каталазной активности принимали количество фермента, расщепляющее 0.1 М H_2O_2 в описанных условиях. Удельную каталазную активность определяли в расчете на 1 мл эритроцитов или 1 г печеночной ткани. Количество металлопротеинов антиоксидантного действия (МАД) (Cu, Zn-СОД и каталазы, полученные из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) - из сыворотки крови) и металлопротеинов прооксидантного действия (МПД) (цитохромы: b_5 - из растворимой фракции эритроцитов, b-558 I и b-558 II - из сыворотки крови, b-558 III и b-558 IV - из мембран эритроцитов; супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки - супрол) определяли путем вычисления величины плотности характерного для данного белка максимального оптического поглощения (в нм): для цитохрома С при 520 (окисленная форма), цитохрома b_5 - 525, цитохромов b-558 - 530 (β -полоса), ЦП - 610, ТФ - 470 и супрола - 420-430 (слабое поглощение). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера.

Таблица 1

Относительные изменения металлопротеинов крови и печени (%) при CCl_4 -индуцированном циррозе печени (ОГ-1) и под воздействием α -токоферола (ОГ-2) по сравнению с контрольными показателями, которые принимаются за 100% ($P < 0.05$; $n=6$)

Металлопротеины	Цирроз (ОГ-1), %	Цирроз + витамин Е (ОГ-2), %
Кровь		
Цитохром b_5	-6.3±0.2	+87.0±5.9
Σ Цитохром b-558 I+II	-45.5±3.3	-18.9±2.0
Σ Цитохром b-558 (до хроматографии)	+10.0±1.0	+16.6±2.1
Цитохром b-558 III	-9.7±0.4	-16.1±1.9
Цитохром b-558 IV	-14.0±1.2	+4.0±0.7
Нейтральный цитохром b-558	-42.2±3.6	-57.9±4.0
Супрол	-50.0±3.9	+17.6±2.3
O_2^- -продуцирующая активность супрола	+28.7±2.4	-9.6±1.1
O_2^- -продуцирующая активность цитохром b-558 III	+11.8±1.0	+18.4±1.4
ЦП	+66.7±3.4	+33.4±2.4
ТФ	-53.4±2.9	+86.1±4.0
СОД	-12.6±1.8	+26.0±2.1
Каталаза	-24.0±2.1	+117.0±6.8
Печень		
Каталаза	-56.2±4.1	-40.0±4.3
Σ Cu, Zn-СОД и Mn-СОД	+47.0±3.4	+42.7±3.1
Цитохром C	-90.6±6.8	-61.2±3.9
МДА	+41.3±3.3	+26.4±3.9

Печеночная ткань у животных ОГ-1 под воздействием CCl_4 подвергалась характерным для цирроза изменениям: прогрессирующему фиброзу, некрозу и структурным изменениям, что привело к частичной гибели животных (24-25%). В ОГ-1 наблюдались и ощутимые смещения

по сравнению с нормой эндогенных уровней металлопротеинов эритроцитов и сыворотки (табл. 1). На фоне ощутимого снижения уровня сывороточных цитохромов b-558 I, b-558 II, нейтрального характера цитохрома b-558 [12], супрола, ТФ, СОД и каталазы наблюдалось небольшое увеличение суммарного уровня эритроцитарных мембранных цитохромов b-558 (до проведения ионообменной хроматографии) и заметное увеличение уровня ЦП. Фактически снижение ТФ компенсируется повышением уровня ЦП. Увеличение уровня ЦП (как белка острой фазы [13]) скорее всего связано с повышением восстановительных процессов в печеночной ткани в ОГ-1.

Таблица 2

**Относительные изменения АС и ПС (%) в крови и печени при
CCl₄-индуцированном циррозе печени (ОГ-1) и под воздействием α-токоферола
(ОГ-2) по сравнению с контрольными показателями, которые принимаются за
100% (P < 0.05; n=6)**

Компоненты крови и печени	Цирроз (ОГ-1)		Цирроз+витамин Е (ОГ-2)	
	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	+23.3±2.2	-68.8±4.9	+119.4±8.1	-10.9±1.2
Эритроциты	-36.6±3.1	+15.6±1.3	+143.0±10.4	+122.0±10.1
Печень	-9.2±0.3	-49.3±3.6	2.7±0.2	-35.8±3.0

В ОГ-1 наблюдаются интенсивные явления, связанные с характерным изменением соотношений между цитохромами b-558 III (гемопротейн кислого характера) и b'-558 III (гемопротейн сильнокислого характера). Примерно 87% цитохрома b-558 III превращается в цитохром b'-558 III в результате цирроза печени. Цитохром b'-558 III практически не растворяется в КФБ при pH 7.4 в отличие от цитохрома b-558 III. Как результат этого цитохром b'-558 III переходит в осадок и растворяется только при pH > 9. Таким образом, при CCl₄-продуцированном циррозе печени наблюдаются изменения в составе эритроцитарных мембран. Это может быть использовано как новый патологический механизм цирроза и как механизм оксидативного повреждения эритроцитарных мембран при циррозе. Такое явление имеет место и при некоторых разновидностях злокачественного опухолеобразования [12, 14].

В печеночной ткани снижение каталазной активности компенсируется повышением СОД-активности (ОГ-1). Резкое снижение уровня цитохрома С свидетельствует о заметном снижении дыхательных метаболических процессов, связанных с переносом электрона в митохондриях печени. С другой стороны, снижение уровня каталазы может вызывать стимулирование липидной пероксидации перекисью водорода [15, 16]. При CCl₄-продуцированном циррозе печени в сыворотке крови антиоксидантный статус (АС - суммарный расчетный уровень антиоксидантных металлопротеинов) намного больше прооксидантного статуса (ПС - суммарный расчетный уровень факторов прооксидантного действия - металлопротеинов), в отличие от эритроцитов, где АС снижен больше, чем ПС

(табл. 2). В печени же ПС снижен намного больше, чем АС (за счет цитохрома С).

В ОГ-2 благодаря введению α -токоферола гибели животных не наблюдается. Не имеет места и процесс окисления цитохрома b-558 III в цитохром b'-558 III и даже наблюдается приближение к норме уровней металлопротеинов крови и печени. Интересно, что в эритроцитах животных ОГ-2 резко увеличивается активность каталазы. Хотя в ОГ-2 наблюдается 29-30%-ное увеличение уровня цитохрома С, однако он остается еще заметно пониженным, низким остается также уровень каталазы в печени (табл. 1).

Как видно из табл. 2, АС в сыворотке крови, эритроцитах и печени намного больше ПС, однако еще не происходит полной нормализации АС и ПС. Эти результаты хорошо корректируются с имеющимися литературными данными [6-8]. Таким образом, при экспериментальном CCl_4 -индуцированном циррозе печени наблюдается существенное нарушение баланса между АС и ПС в крови и печени, а α -токоферол в большинстве случаев играет положительную антистрессорную роль.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

Литература

1. *Gonzalez-Reimers E., Lopez-Lirola A., Olivera R. M. et.al.* - Biol. Trace. Elem. Res. 2003. V. 93. P. 127-140.
2. *Cabre M., Camps J., Ferre N. et. al.* - Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2001. V. 71. P. 229-236.
3. *Irshad M., Chaudhuri P. S., Joshi Y. K.* - Hepatol. Res. 2002. V. 23. P. 178-184.
4. *Koruk M., Aksoy H., Akcay F., Onuk M. D.* - Ann. Clin. Lab. Sci. 2002. V. 32. P. 252-256.
5. *Tanaka A., Morimoto T., Wakashiro S. et. al.* - Life Sci. 1987. V. 41. P. 741-748.
6. *Fields M., Lewis C. G.* - Ann. Clin. Biochem. 1997. V. 13. P. 656-663.
7. *Sakuma N., Noguchi Y., Hibino T.* - Nippon Ronen Igakka, Zasshi. 1997. V. 34. P. 729-732.
8. *Noguchi N., Gotoh N., Niki E.* - Biofactors. 1998. V. 7. P. 41-50.
9. *Симонян М. А., Симонян Г. М.* Способ получения металлопротеинов крови. Ереван. 1997. Армпатент. Лицензия изобретения N 341.
10. *Симонян М. А.* Способ получения супероксиддисмутазы из животного сырья. Открытия, изобретения. 1988. N 28. С. 107.
11. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Наука. М. 1972. 252 с.
12. *Симонян Г. М.* Оксидативный стресс при злокачественных новообразованиях. Автореф. канд. дис. Институт биохимии. 2003.
13. *Мжельская Т. И.* - Бюлл. эксп. биол. и мед. 2000. N130. С. 124-132.
14. *Симонян Г. М., Симонян Р. М., Бабалян М. А., Нерсисян А. К., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 2003. Т. 43. N 2. С. 31-34.
15. *Afanasev I.B., Dorozhk A. I.* - Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 302. P. 200-227.
16. *Toren F.* - Current Opinion in cell biol. 1998. V. 10. P. 248-253.

Ա. Ս. Մարգարյան, Ա. Ա. Միմոնյան, Մ. Ա. Միմոնյան,
ակադեմիկոս Ա. Ա. Ավետիսյան

Առնետների արյան և լյարդի մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների
փոփոխությունները CCl_4 -ով մակածված լյարդի ցիռոզի դեպքում և
 α -տոկոֆերոլի հակաստրեսային ազդեցությունը

Առնետի լյարդի CCl_4 -ով մակածված ցիռոզի դեպքում դիտվում է լյարդի հյուսվածքին բնորոշ ֆիբրոզ և ձևափոխություններ: Դա ուղեկցվում է արյան շիճուկում, էրիթրոցիտներում և լյարդում հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների շեղումներով, ստեղծելով նշված հյուսվածքներում օքսիդատիվ վնասումների որոշակի ֆոն: Դիտվում է էրիթրոցիտների թաղանթային ցիտոքրոմ b-558 III-ի ինքնաազդեցական ինտենսիվացում, որը հանգեցնում է այդ թաղանթների հոսունեղիության նվազմանը: Փորձի IV, VII և XV օրերին α -տոկոֆերոլի ներդրովայնային ներարկումը (2 մգ/կգ մեկ առնետի հաշվով) որոշակիորեն նվազեցնում է այդ շեղումները, դրսևորելով դրական, հակաստրեսային ազդեցություն: