

УДК 577.612.01

Р. М. Симонян, Г. М. Симонян, М. А. Симонян

Ингибирование цитохромом b558III супероксид-продуцирующей активности супрола и ее стимулирование тетрахлором углерода *in vitro*

(Представлено академиком М. А. Давтяном 16/III 2005)

Супероксид-продуцирующий липопротейн - супрол локализован в сыворотке крови млекопитающих [1] и рыб [2] и является липопротеином высокой плотности, продуцирующим супероксидные радикалы (O_2^-) в присутствии следов ионов переходных металлов (Fe^{+3} , Cu^{+2}) *in vitro* и *in vivo* [3]. Это имеет место, в частности, при интоксикации крыс ионами переходных металлов [4,5], а также при сердечно-сосудистых заболеваниях [6].

Продуцированные O_2^- и их производные ($1O_2$, H_2O_2 , $HO^\bullet$, $NO^\bullet$ и др.) инициируют перекисное окисление фосфолипидных остатков самого супрола, вызывая агрегацию супрола. Это, в свою очередь, может изменить вязкость крови и воздействовать на гемодинамику и тромбообразование [7]. Супрол продуцирует O_2^- в течение сравнительно долгого времени (5-6 ч) в аэробных условиях *in vitro*, в отличие от других O_2^- -продуцирующих систем [7]. При этом продуцированные O_2^- нормально дисмутируются антиоксидантными препаратами различного характера [7]. Обнаружение биологических средств, ингибирующих продуцирование O_2^- супролом, может иметь важное значение для стабилизации или предотвращения агрегации супрола. По предварительным результатам супрол продуцирует

O_2^- и в присутствии следов "связанного" железа (например, железа гемовой группы гемоглобина), а цитохром (цит) b558III обладает способностью образовывать нестабильный комплекс с метгемоглобином (метHb) за счет $NO^\bullet$, присутствующего в гемовой группе цит b558III как 5-й или 6-й лиганд железа [8]. Целью работы явилось определение характера воздействия цит b558III и CCl_4 на супероксид-продуцирующую активность супрола *in vitro*

Цит b558III из эритроцитарных мембран (ЭМ) и супрол из сыворотки крови крыс получали биотехнологическим способом [9], без использования детергента [10]. При этом цит b558III получается в электрофоретически гомогенном состоянии, а супрол содержит небольшие следы гемопротеина (Hb). Активирование супрола (для продуцирования O_2^-) осуществляли следами ионов Fe^{+3} [3]. O_2^- -продуцирующую активность супрола и цит b558III определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [9], рассчитав проценты повышения плотности

максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), образовавшегося в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола или цит b558III принимали количество белка, вызывающее 50%-ное увеличение плотности поглощения формазана. Удельная O_2^- -продуцирующая активность супрола и цит b558III была определена в расчете на 1 мл сыворотки и эритроцитов соответственно.

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см при 20°.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с расчетом критерия достоверности Р.

В результате небольшого гемолиза эритроцитов (наблюдающегося при декапитировании крыс) супрол образует нестабильное комплексное соединение с метНб (рис.1,1). После активирования такого супрола ионами Fe^{+3} форма его оптического спектра не изменяется. При этом на спектре видны характерные максимальные поглощения Нб (альфа- и бета-полосы поглощения).

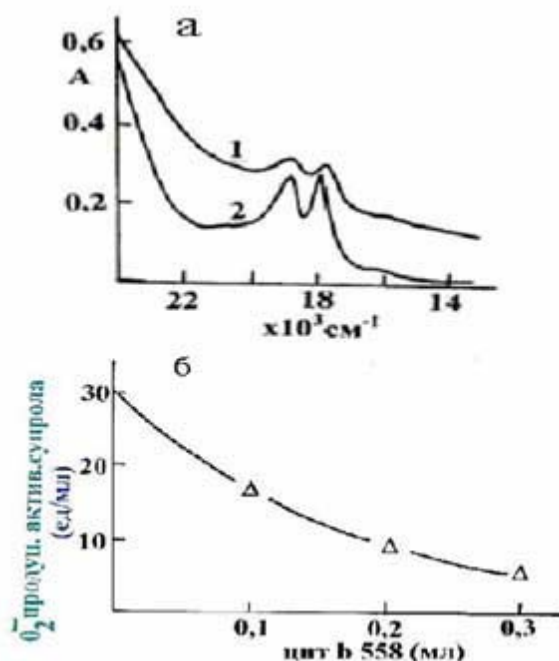


Рис.1.

После агрегации (самоосаждения) супрола в результате инкубирования при 4° в течение 40-50 ч в аэробных условиях и центрифугирования его осадок имеет красноватый цвет, а супернатант бесцветный. Это свидетельствует о том, что Нб действительно входит в комплексное соединение с супролом. После гомогенизации в 0.04 М калий фосфатном буфере (КФБ) осадка агрегированного с Нб супрола смесь проявляет O_2^- -продуцирующую

активность (рис.2). Под влиянием добавленного цит b558III ($A_{530} = 0.2$) наблюдается снижение ($60.5 \pm 6.4\%$, $n = 6$, $P < 0.05$) O_2^- - продуцирующей активности супрола с $A_{430} = 0.02$ в реакционной смеси. В результате его инкубирования (в течение 20-30 мин) с цит b558III при 20° наблюдается отщепление Hb от супрола и присоединение его к цит b558III.

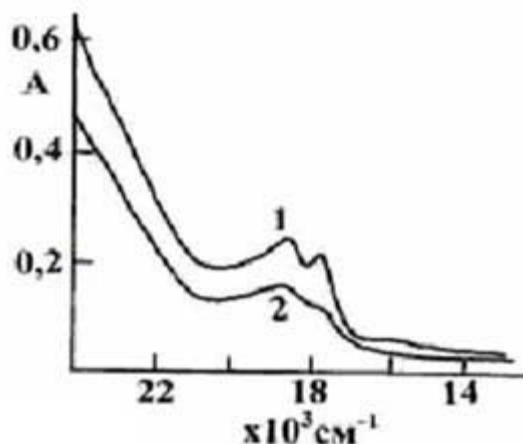


Рис.2.

При этом осадок агрегированного супрола теряет красный цвет, а супернатант (комплекс цит b558III с Hb) представляет из себя раствор красноватого цвета. Спектр этого раствора имеет смешанную форму спектров Hb и цит b558III, что характерно для комплекса Hb с цит b558III [11] (рис.3).

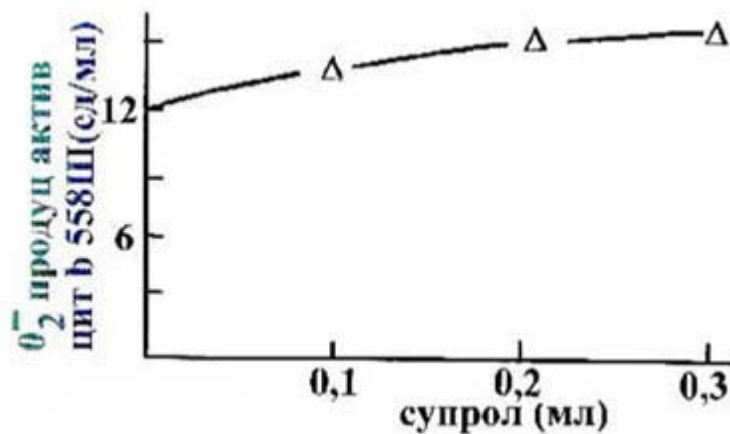


Рис.3.

НАДРН-зависимая O_2^- -продуцирующая активность комплекса цит b558III с Hb на 20-30% выше таковой у цит b558III (рис.4, а). Видимо, в этом состоянии Hb, как ионы переходных металлов, служит переносчиком электрона от НАДРН (группа в молекуле супрола) к молекулярному кислороду, превращая его в O_2^- [3]. Цит b558III входит в комплексное

соединение с отщепленным от супрола Hb, в результате чего происходит дезактивирование супрола. Одновременно несколько повышается O_2^- -продуцирующая активность цит b558III. Фактически цит b558III очищает супрол от следов Hb и дезактивирует этот липопротеин сыворотки высокой плотности, повышая его стабильность. Таким образом, проявляется "антиоксидантный" эффект цит b558III, предотвращающий продуцирование O_2^- супролом и подавляющий перекисное окисление фосфолипидных остатков супрола супероксидными радикалами. Это имеет большое значение для сохранения стабильности супрола, соответственно и нормальной вязкости сыворотки.

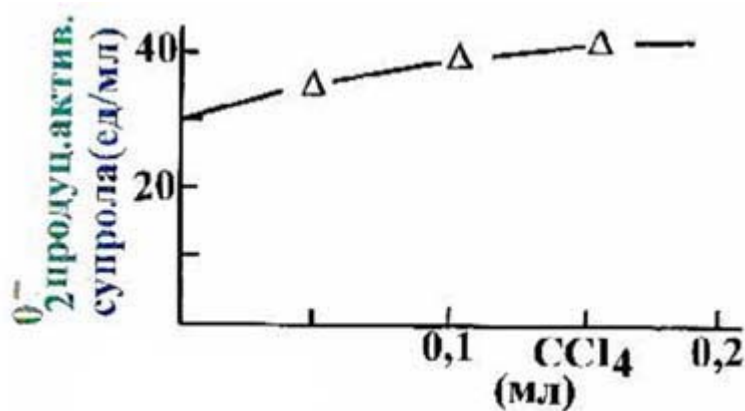


Рис.4.

Под воздействием CCl_4 (рис 4, б) наблюдается повышение O_2^- -продуцирующей активности супрола ($31.4 \pm 3.2\%$, $P < 0.03$), что, возможно, связано с повышением "растворимости" супрола как липопротеина высокой плотности в гидрофобной среде CCl_4 . Видимо, на начальных этапах экспериментального цирроза печени крыс под воздействием CCl_4 происходит повышение O_2^- -продуцирующей активности и липидной пероксидации супрола с соответственным повышением вязкости сыворотки и возможным изменением гемодинамики. Эти обстоятельства вынуждают переоценить токсические эффекты CCl_4 . С другой стороны, подавление O_2^- -продуцирующей активности супрола, расщепление комплекса супрола с Hb и захват последнего цитохромом b558III являются новыми факторами "очищения" сыворотки, повышения стабильности липопротеина сыворотки высокой плотности - супрола и сохранения нормальной вязкости крови в целом. Исходя из того, что цит b558III локализован на внешней поверхности ЭМ [11], не исключается аналогичная роль цит b558III и в гетерогенной фазе (в ЭМ).

Литература

1. *Симонян М. А., Карапетян А. В., Бабаян М. А., Симонян М. А.* - Биохимия. 1996. Т. 61. № 5. С. 932-938.
2. *Симонян Г. М., Симонян М. А., Карагезян К. Г.* - ДНАН Армении. 2003. Т. 103. № 2. С. 151-153.
3. *Симонян Г. М., Бабаян М. А., Симонян Р. М., Симонян М. А.* - Биол. ж. Армении. 1999. Т. 1. № 52. С. 18-21.
4. *Оксузьян Г. Р., Симонян Р. М., Симонян М. А., Алексанян С. С.* - Мед. наука Армении. 2001. Т. 41. № 2. С. 21-26.
5. *Оксузьян Г. Р., Симонян Р. М., Бабаян М. А., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 2002. Т. 42. № 2. С. 3-6.
6. *Алексанян Серг. С., Алексанян С. С., Симонян Г. М.* - Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга. 2004. Т. 9. № 8. С. 198-200.
7. *Симонян Р. М., Симонян Г. М., Симонян М. А.* - Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга. 2004. Т. 9. № 8. С. 72-79.
8. *Симонян Р. М.* Новые факторы оксидативного повреждения компонентов крови. Автореф. канд. дис. Ин-т биохимии НАН РА. Ереван. 2004.
9. *Симонян М. А., Симонян Г. М.* Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван. 1997.
10. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Симонян Р. М.* Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия № 908 Армпатента. Ереван. 2001.
11. *Симонян Г. М., Симонян Р. М., Бабаян М. А., Карапетян А. В., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 2003. Т. 43, № 1. С. 30-38.

Ռ. Մ. Միմոնյան, Գ. Մ. Միմոնյան, Մ. Ա. Միմոնյան

**Ցիտոքրոմ b558 III-ով սուպրոլի սուպերօքսիդ - գոյացման ակտիվության արգելակումը և
դրա խթանումը ածխածնի տետրաքլորով in vitro**

Էրիթրոցիտների թաղանթների ցիտոքրոմ (ցիտ) b558 III-ը ընկճում է ($60.5 \pm 6.4\%$, $n = 6$, $P < 0.05$), իսկ ածխածնի տետրաքլորիդը (CCl_4) խթանում է ($31.4 \pm 3.2\%$, $n = 6$, $P < 0.03$) շիճուկից անջատված և բարձր խտություն ունեցող լիպոպրոտեինի (սուպրոլ) սուպերօքսիդ-գոյացնելու ակտիվությունը in vitro: Միաժամանակ մեծանում է ցիտ b558 III-ի սուպերօքսիդ-գոյացնելու ակտիվությունը (20-30%):

Ընկճելով սուպրոլի սուպերօքսիդ ռադիկալներով հարուցված լիպիդային պերօքսիդացումը՝ ցիտ. b558 III-ը նպաստում է սուպրոլի կայունության պահպանմանը, իսկ CCl_4 -ը, ընդհակառակը՝ նվազեցնում է այն:

R. M. Simonyan, G. M. Simonyan, M. A. Simonyan

**The Inhibition by Cytochrome b558III of the Superoxide-Producing Activity
of Suprol and its Stimulation by Carbone Tetrachloride in Vitro**

The erythrocyte membranes cytochrome b558 reduces ($60.5 \pm 6.4\%$, $n = 6$, $P < 0.05$), and CCl_4 stimulates ($31.4 \pm 3.2\%$, $n = 6$, $P < 0.03$) the O_2^- producing activity of high density lipoprotein of serum - suprol in vitro. Moreover, the NADPH-dependent O_2^- producing activity of cytochrome b558III is increasing (20-30%). Thus, cytochrome b558 III elevates the stability of suprol, whereas CCl_4 , on the contrary, reduces it.