

УДК 577.1:616.1:616-056

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ АНТИОКСИДАНТНЫХ И НОВЫХ ПРООКСИДАНТНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

В.М.Арутюнян, М.А.Симонян, М.Б.Чакарян, Г.С.Акопян,
Р.М.Симонян

*/Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци,
РМЦ "Армения", Институт биохимии НАН РА/
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: периодическая болезнь, антиоксиданты, металлопротеины, ПОЛ, прооксиданты, активные соединения кислорода

У больных периодической болезнью (ПБ) [4], как и при различных проявлениях оксидативного стресса [17,19,22], активизируются процессы ПОЛ клеточных мембран [13,15] с одновременным уменьшением активности антиоксидантных систем организма [10,20,28].

Известно, что промежуточные продукты ПОЛ, особенно гидроперекиси, в умеренных концентрациях изменяют структуру и функцию клеточных мембран, в частности путем изменения активности мембраносвязанных ферментов, устойчивости липидно-липидных и липидно-белковых комплексов, и тем самым регулируют физиологическую активность клеток, т.е. умеренно выраженное ПОЛ является составной частью жизнедеятельности организма. При чрезмерной активации ПОЛ в биологических мембранах накапливаются конечные продукты перекисидации — альдегиды, кетоны, окисленные жирные кислоты, которые токсически воздействуют на клетки путем нарушения митоза, безвозвратно инактивируют ферменты и повреждают мембраны [2].

ПОЛ инициирует активные интермедиаты кислорода (АИК) (O_2^- ; $HO^\bullet$; $ROO^\bullet$; H_2O_2 и т.д.), которые в физиологических количествах являются нормальными метаболитами свободно радикальных аэробных окислительных процессов [21].

Физиологический уровень АИК и ПОЛ в организме поддерживается системой антиоксидантной защиты клетки (глутатион редуктаза, глутатион пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза и т.д.).

Любые нарушения существующего равновесия между содержаниями систем продуцирующих и утилизирующих активные метаболиты кислорода приводят к возникновению патологического состояния [6,11,27].

Задачей настоящей работы является выявление количественных характеристик антиоксидантных (Cu, Zn, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза) и прооксидантных (цитохром b_{558III} , b_{558IV} и супрол) металлопротеинов в крови больных ПБ на различных стадиях заболевания.

Материал и методы

Стабилизированную на цитрате кровь, забранную из локтевой вены у 12 больных ПБ без осложнений в возрасте 17–38 лет вне приступа (ОП-1) и во время приступа (ОП-2) и у 15 доноров (К) того же возраста, исследовали на предмет определения: СОД и каталазы (из гемолизата эритроцитов), супрола (из сыворотки крови) и цитохромов (b_{558III} и b_{558IV}) из мембран эритроцитов. Указанные вещества выделяли и очищали по способу [8], используя методы ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 (фирма "Whatman", Англия) и гель-фильтрации на биогелях Р-60 и Р-150 (фирма "Reanal", Венгрия).

Супероксиддисмутазную активность полученных фракций определяли нитротетразолиевым (НТС) методом [23], принимая за единицу активности то количество фермента, которое способно ингибировать процесс образования формазана при восстановлении НТС супероксидными радикалами (O_2^-) на 50%.

Каталазную активность определяли по методу [9], принимая за единицу активности то количество фермента, которое вызывает расщепление (за 1 мин при 20°C) H_2O_2 в количестве $\Delta A_{240} = 0,01$ (это разница величин оптического поглощения перекиси водорода до и после подачи фермента при 240 нм). Активность ферментов была определена в расчете 1 мл белковой фракции.

Продукт ПОЛ — малоновый диальдегид (МДА) как количественный показатель для супрола определяли по общеизвестному методу Владимиров и др. [3] в присутствии аскорбата, его количественно выражали в н/моль на 1 мг белка по величине оптического поглощения этого липопротеина при 425–430 нм, для цитохромов b_{558III} и b_{558IV} — при 560 нм (окисленное состояние гемопротеинов).

Супрол активизировали путем присоединения этого липопротеина к следам Fe^{+3} , как это показано в работе [7].

O_2^- -продуцирующую способность супрола определяли нитротетразолиевым и адреналиновым методами на основании прироста поглощения формазана при 588 нм (ΔA_{588}) или адrenoхрома — при 500 нм (ΔA_{500}).

Содержание белка определяли методом Лоури [18]. Оптические спектры поглощения регистрировались прибором "Specord" (Германия) с длиной оптического пути — 1 см, при 20°.

В процедуре выделения и очистки белковых веществ были использованы центрифуги К-23 и К-24 (фирма "MLW Zentrifugenbaum Engsdorf", Германия). Всего было проведено 4 выделения вышеуказанных белков (при каждом выделении брали 20 мл цельной крови).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли общеизвестным методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При ПБ активность антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы) падает в 1,5-2 раза, особенно во время приступа. Содержание же новых прооксидантных гемопротеинов прооксидантного характера цитохромов b_{558III} и b_{558IV} повышено в 2-3 раза, и это также более ощутимо во время приступа (табл. 1).

Таблица 1

Активность СОД, каталазы и количество (плотность оптического поглощения при 560 нм) цитохромов b_{558III} и b_{558IV} у больных ПБ, $P < 0,05$

Металлопротеины и активность ферментов	К	ОП-1	ОП-2
Цитохром b_{558III} (A_{560})	0.2 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.68 ± 0.02
Цитохром b_{558IV} (A_{560})	0.12 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.02
Супероксиддисмутазная активность (ед/мл)	320 ± 8	240 ± 5	150 ± 3
Каталазная активность (ед/мл)	1200 ± 10	970 ± 12	610 ± 4

Таблица 2

Количество (оптическое поглощение), O_2^- -продуцирующая активность супрола, а также концентрация МДА в растворах активизированного супрола в сыворотке крови больных ПБ

Биохимические показатели	К	ОП-1	ОП-2
Плотность поглощения супрола при 430 нм	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.02
O_2^- -продуцирующая активность супрола (ΔA_{558})	0.20^*	0.15^{**}	0.22^{***}
МДА нмоль/мг белка	85 ± 2	123 ± 6	210 ± 8

Примечание. * — рост поглощения формазана при восстановлении НТС супероксидными радикалами в присутствии 5 нг супрола из донорской крови по сравнению с пробами без добавления супрола к реакционной смеси; ** — то же в присутствии 12 нг супрола из крови больных ПБ вне приступа; *** — то же во время приступа ПБ. Аналогичные результаты получаются и при окислении адреналина в адренохром (ΔA_{500}) супероксидными радикалами, генерированными активным супролом в таких же количествах (эти данные не приводятся)

Заметно повышается также количество супрола в сыворотке крови больных ПБ, особенно во время приступа (в 2–4 раза) (табл.2).

Фактический прирост количества белков прооксидантного характера цитохромов b_{558III} и b_{558IV} , а также супрола происходит на фоне уменьшения активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы. Видимо, это связано с повышением уровня ПОЛ у больных ПБ, особенно во время приступа с участием активных соединений кислорода, которые способны различными механизмами инактивизировать СОД и каталазу [6,10,28].

Несмотря на то, что содержание супрола при ПБ повышено приблизительно в 4 раза (количество МДА также повышается приблизительно в 2 раза), адекватного повышения активности этого липопротейна не происходит, более того, его активность продуцирования O_2^- падает (теряется способность активирования ионами Fe^{+3}).

В условиях *in vitro* показано, что при инкубировании раствора супрола в аэробных условиях при $4^\circ C$ в течение 8–10 дней количество МДА в самом супроле возросло приблизительно в 2 раза и почти настолько же упала O_2^- -продуцирующая активность супрола [7].

Т.е. в условиях *in vitro* и *in vivo* в результате перекисного окисления супрола падает его способность активироваться ионами Fe^{+3} .

Возможно, и в условиях *in vivo* происходит активирование супрола в результате нарушения метаболизма железа (возможно при ПБ образуются "свободные" Fe^{+3} , которые всегда присутствуют в синовиальных и цереброспинальных жидкостях [16]). Адекватное повышение содержания цит. b_{558III} и b_{558IV} , супрола и МДА предполагают участие этих прооксидантов в процессах ПОЛ, хотя бы путем продуцирования O_2^- , который является энергичным инициатором процесса ПОЛ [25]. Надо учесть и тот факт, что цитохромы b_{558IV} являются субстратами для НАДРН-зависимых оксидоредуктаз, локализованных в мембранах форменных элементов крови и субклеточных образований. Эти ферменты продуцируют O_2^- , $HO^\bullet$; $H_2O_2^\bullet$, которые в физиологических концентрациях обезвреживают различные антигены (это один из возможных механизмов иммунной защиты) [12,24,26].

Полученные результаты дают основание предположить, что применение экзогенных антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, церулоплазмин, трансферин, особенно их комбинация) даст хороший терапевтический эффект при ПБ путем регулирования активности процессов перекисеобразования и уровня эндогенных антиоксидантов. Тем более, что эти препараты широко применяются при лечении различных заболеваний оксидативно-стрессорного характера уже около 15 лет [14], и по своим антиоксидантным свойствам они гораздо эффективнее, чем витаминные антиоксиданты, применяемые для лечения больных ПБ [1,5].

Поступила 10.12.96

**ՀԱՎԱՌՔՍԻՂԱՆՏԱՅԻՆ ԵՎ ՆՈՐ ՊՐՈՔՍԻԴԱՅԻՆ
ՄԵՏԱՂԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ՄԱԿԱՐԳԱԿՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԳՈՒԹՅԱՄԲ ՀԻՎԱՆԳՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՄԵՋ**

**Վ.Մ.Հարությունյան, Մ.Ա.Սիմոնյան, Մ.Բ.Չաքարյան,
Գ.Ս.Հակոբյան, Ռ.Ս.Սիմոնյան**

Պարբերական հիվանդության (ՊՀ) ժամանակ հակաօքսիդանտային ֆերմենտների (սուպերօքսիդիմուտազ եւ կատալազ) ակտիվությունը, հատկապես նույնի ժամանակ, իջնում է 1,5-2 անգամ, իսկ նոր պրոօքսիդանտային բնույթի հեմոպրոտեինների՝ ցիտոքրոմներ b_{558III} , b_{558IV} եւ սուպրոլի քանակը բարձրանում է 2-3 անգամ:

Այս տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ ՊՀ ժամանակ ակտիվացած են լիպիդների ազատ ռադիկալային օքսիդացման պրոցեսները, եւ էկզոգեն հակաօքսիդանտային ֆերմենտների կիրառումը կարող է տալ լավ թերապեւտիկ արդյունք:

**THE CHANGES OF ANTIOXIDANTS AND NEW PROOXIDIC METALOPROTEINES
LEVELS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH PERIODIC DISEASE**

**V.M.Haroutyunian, M.A.Simonian, M.B.Chakarian,
G.S.Hakopian, R.M.Simonian**

In case of periodic disease (PD) the activity of antioxidant enzymes, (superoxide dismutase and catalase), decreases by 1,5–2 times, especially during the attack, while the level of haemoproteins of new prooxidants type, like cytochromes b_{558III} и b_{558IV} and suprole, is increased by 2–3 times.

All these data allow to make a conclusion that in PD the processes of oxidation of lipids free radicals are activated, and the administration of exogenic antioxidant enzymes will give a good therapeutic effect.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян Г.С. Некоторые подходы к патогенетическому лечению периодической болезни. Автореф. канд. дис., Ереван, 1993.
2. Бурлакова Е.Б., Джалябова М.И. Влияние липидов мембран на активность ферментов. В кн.: Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах. М., 1972.
4. Закарян А.Е., Назаретян Э.Е., Акопян Г.С. Интенсивность хемилюминесценции плазмы крови у больных периодической болезнью. Ж. Экспер. и клин. мед., 1993, 1-2, с.44.
5. Назаретян Э.Е., Акопян Г.С. Периодическая болезнь. Ереван, 1993.
6. Симонян М.А. SOD и новые системы продуцирования активных соединений кислорода. Автореф. докт. дис., Ереван, 1996.
7. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М. NADPH-содержащая, O_2^- -продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови. Выделение, очистка, краткая характеристика и механизм действия. Биохимия, 1996, 61(5), с. 932.
8. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Способ получения металлопротеинов. Изобретение N 000610. Патентное управление РА, Ереван, 1996.

9. *Abel H.* Methods of enzymatic analysis — Ed. Bergmeyer U. Acad. Press., N.Y. 1974, 2, p. 673.
10. *Anneren K.G., Epstein C.J.* Lipid peroxidation and SOD-1, and glutathione peroxidase activities in trisomy - 16 fetal mice and human trisomy - 21 fibroblasts. *Pediatr. Res.*, 1987, 21(1), p.88.
11. *Fridovich I.* O_2^- and SOD -s. *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, 64, p.97.
12. *Gabig T.G., Lefker B.A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 118, p.430.
13. *Girotti A.W., Thomas J.P.* O_2^- and H_2O_2 -dependent lipid peroxidation in intact and triton-dispersed erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 118(2), p.474.
14. *Greenwald R.A., Long T.J.* SOD and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Rad. Biol. Med.*, 1990, 8(2), p. 201.
15. *Gutteridge J.M.C.* The role of O_2^- and HO-radicals in phospholipid peroxidation catalyzed by iron salts. *FEBS Lett.*, 1982, 150(2), p. 454.
16. *Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Halliwell B.* *Biochem. J.*, 1981, 199, p. 263.
17. *Kihara H.* Stress and O_2^- -production by human neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 650 p. 307.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.* *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, p. 265.
19. *Luca A., Fsterbauer H.* Lipid peroxidation in human diseases: Evidence of red cell oxidative stress after circulatory shock. *Free Rad. Biol. Med.*, 1989, 6(2), p.167.
20. *Matkovic B., Laszlo A., Szabo L.* A comparative study of SOD, catalase and lipid peroxidation in red blood cells from muscular dystrophy patient and normal controls. *Clin. Chim. Acta.*, 1982, 118(2-3), p.284.
21. *Muller M., Dumdey R., Rappoport S.* O_2^- in the metabolism of the red cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 42(11-12), p.297.
22. *Nishida T.* Oxidative stress. Review. *Chikusan no Kenkyu*, 1994, 48(11), p. 1198.
23. *Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K.* The occurrence of O_2^- in the reaction of reduced PMS and O . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46(2), p. 849.
24. *Rossi P.* The O_2^- -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. Review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 853(1), p.65.
25. *Tien M., Svingen B.A., Aust S.D.* O_2^- dependent lipid peroxidation. *Feder. Proceed.*, 1981, 40(2), p.179.
26. *Segal A.W., Cross A.R., Carcia R.C.* *N. Engl. J. Med.*, 1983, 308, p.245.
27. *Tsan M.F.* SOD and pulmonary oxygen toxicity. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1993, 203(3), p. 286.
28. *Winterbourn C.C.* Free radical toxicity and antioxidant defence. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1995, 22(11), p.877.