

ХАРАКТЕРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОГЕННОГО УРОВНЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ АНТИОКСИДАНТНОГО И ПРООКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ КРЫС ИОНАМИ $Cu(II)$

Г.Р.Оксузян, М.А.Симонян, С.С.Алексян, Р.М.Симонян, М.А.Бабаян

*/Гюмрийский пед. институт, Институт биохимии НАН РА/
375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: кровь, металлопротеины, острая медная интоксикация

Ионы меди $Cu(II)$ как составные части многих белковых ферментных систем являются необходимыми компонентами гомеостаза. Нарушение метаболизма этого металла приводит к многочисленным проявлениям оксидативного повреждения биосистем с возникновением болезненных явлений (пневмония [17], хроническая ишемия нижних конечностей [10], ожоги [7], болезнь Вильсона [13]). Попадающие в организм ионы $Cu(II)$ в основном связываются с церулоплазмином (ЦП) в плазме крови и металлотионеином в печени. Эта «связанная» медь не обладает окислительно-восстановительной активностью, однако при различных патологических состояниях в организме присутствует и «свободная» медь, которая, образуя слабую связь с другими молекулами, обладает окислительно-восстановительной активностью. При болезни Вильсона и гепатокарциноме в плазме и печени крыс обнаружено повышение уровня свободной меди на фоне потери феррооксидазной активности ЦП в сыворотке крови. При нарушении функции желчи уровень меди в печени несколько снижается, но возрастает в плазме, оставаясь ещё повышенным по сравнению с нормой. Именно эта свободная медь катализирует реакцию Фентона, продуцируя гидроксильные радикалы ($HO^{\bullet}$) при восстановлении перекиси водорода, а $HO^{\bullet}$ могут играть ключевую роль в процессе возникновения гепатита и гепатокарциномы [13]. Уровень $Cu(II)$, ЦП и эритроцитарной Cu, Zn -СОД возрастает при критической ишемии нижних конечностей человека и почти не изменяются при умеренной ишемии. Дефицит меди приводит к понижению уровня ЦП, однако при ожоге уровень этого металлопротеина сохраняется даже после употребления витамина C , а снабжение медью приводит к нормализации эндогенного уровня ЦП. Повышение уровня ЦП при воспалении и травме дало основание квалифицировать его как белок острой фазы, способный подавлять процесс перекисного окисления липидов плазмы ионами меди [8]. Адаптационные механизмы организма при хронической и острой интоксикации ионами $Cu(II)$ и цинком приводят к повышению уровня ЦП [9].

Введение в кровь крыс $Cu(II)$ в виде Cu, Zn -EDTA комплекса с лечебной целью при недостаточности меди не приводит к нежелательным явлениям в биосистемах, однако при повышенных дозах (64 мг/кг) происходит линейное накопление $Cu(II)$ или $Ca(II)$ в крови и печени (134 мкг/ч), вызывая дегенеративные явления в печени и почках при геморрагии и некрозе. Можно предположить об идентичности скорости проницаемости и воздействия $Cu(II)$ или $Ca(II)$ в этих процессах при острой и хронической интоксикации этими металлами [9].

Ранее нами определялись характерные количественные сдвиги металлопротеинов крови крыс анти- и прооксидантного действия – регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК) при хронической медной интоксикации диетической медью [1]. Целью данного исследования является определение сдвигов эндогенного уровня этих металлопротеинов при острой медной интоксикации путем непосредственного введения в организм крыс токсических доз Cu(II) в различные периоды интоксикации.

Материал и методы

Белые крысы-самцы массой 200–220 г, содержащиеся на полноценном рационе за 20 дней до начала эксперимента, были разделены на 3 группы (по 12 в каждой). Контрольные крысы (К) получали физраствор в аналогичных объемах и сроках; животные I опытной группы (ОГ-1) получали внутривенно по 30 мг/кг Cu(II) в виде раствора CuSO_4 и были декапитированы под легким эфирным наркозом через 3 ч после введения меди. Животные II опытной группы (ОГ-2) получали медь и были декапитированы через 20 ч. Кровь животных собирали в отдельности и стабилизировали натрий-оксалатным буфером. Металлопротеины крови прооксидантного действия (цитохром b_5 получали из растворимой фракции эритроцитов; цитохромы $b_{558\text{I}}$ и $b_{558\text{II}}$ – из сыворотки крови; цитохромы $b_{558\text{III}}$ и $b_{558\text{IV}}$ – из мембран эритроцитов; суммарная фракция цитохромов b_{558} – из мембран эритроцитов; супрол-супероксидпродуцирующий липопротеин – из сыворотки) и металлопротеины крови антиоксидантного действия (Cu, Zn-SOD и каталаза, выделенные из растворимой фракции эритроцитов, ЦП и трансферрин (ТФ) – из сыворотки крови) одновременно были выделены и очищены по разработанному нами способу [2] с некоторыми изменениями в целях избежания использования детергента для солиubilизации эритроцитарных мембранных гемопротеинов, т.к. детергент снижает стабильность этих гемопротеинов. Отдиализованные белковые фракции сыворотки, эритроцитарных мембран и плазматической части эритроцитов подвергали ионо-обменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексом DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) с последующей гель-фильтрацией на биогеле Р-100.

Количество полученных металлопротеинов определяли по величине плотности максимальных оптических поглощений, характерных для цитохрома b_5 при 525 нм, цитохромов $b_{558\text{I-IV}}$ при 530 нм, супрола – 430 нм (слабое плечо), ЦП – 610 нм, ТФ – 470 нм. Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли нитротетразолиевым синим методом (НТС) [14], рассчитав проценты ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении нитротетразолия синего супероксидными радикалами в присутствии супероксиддисмутазы (СОД) или супрола, соответственно. Катализную активность определяли перманганатометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (М) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°. Удельная активность приведенных ферментов определялась в расчете на 1 мл эритроцитов или 1 мл сыворотки. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В процессе получения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия) и стеклянные колонки с фильтрами различных размеров (2 × 30, 4 × 20, 2 × 70 см).

Опыт повторялся 4 раза для проверки воспроизводимости полученных показателей. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

В зависимости от продолжительности острой медной интоксикации (ОМИ) динамика изменений эндогенного уровня металлопротеинов анти- и прооксидантного действия – регуляторов метаболизма АФК в крови – ощутимо различается, хотя тенденциозность приведенных изменений несколько сохраняется (таблица). По сравнению с показателями животных контрольной группы в ОГ-1 наблюдается повышение уровня прооксидантных металлопротеинов: цитохрома b_5 , суммарной фракции эритроцитарных цитохромов b_{558} , основного характера цитохрома b_{558IV} и незначительное увеличение содержания суммарной фракции сывороточных цитохромов b_{558I} и b_{558II} . Уровень же кислого характера цитохрома b_{558III} мембран эритроцитов снижен в тех же количествах. В ОГ-1 несколько снижен уровень супрола, а его O_2^- -продуцирующая активность возросла. На фоне повышения уровня ЦП в ОГ-1 содержание ТФ и СОД практически не изменяется, однако активность каталазы снижается.

Таблица

Уровень анти- и прооксидантных металлопротеинов крови крыс (%) при острой интоксикации ионами $Cu(II)$ по сравнению с контролем, показатели которого принимаются за 100% ($M \pm m$, $n=4$)

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2
Цитохром b_5	$+25.3 \pm 2.4$ $p < 0.05$	$+62.4 \pm 6.1$ $p < 0.05$
Сумма цитохромов b_{558I} и b_{558II}	$+5.5 \pm 0.1$ $p < 0.01$	-5.6 ± 0.3 $p < 0.01$
Сумма эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558}	$+24.3 \pm 2.6$ $p < 0.02$	$+18.9 \pm 1.9$ $p < 0.02$
Цитохром b_{558III}	-28.3 ± 3.1 $p < 0.002$	$+80.0 \pm 8.3$ $p < 0.002$
Цитохром b_{558IV}	$+29.4 \pm 2.5$ $p < 0.05$	$+4.5 \pm 0.3$ $p < 0.01$
Супрол	-9.4 ± 0.9 $p < 0.02$	-71.5 ± 7.9 $p < 0.004$
Церулоплазмин	$+40.2 \pm 4.1$ $p < 0.01$	$+21.1 \pm 1.8$ $p < 0.05$
Трансферрин	нет изм.	$+33.3 \pm 3.2$ $p < 0.05$
СОД	нет изм.	$+2.5 \pm 0.1$ $p < 0.05$
Каталаза	-25.2 ± 2.4 $p < 0.02$	-25.1 ± 2.3 $p < 0.01$
O_2^- -продуцирующая активность супрола	$+29.3 \pm 2.5$ $p < 0.05$	$+63.9 \pm 5.3$ $p < 0.05$

В ОГ-2 (при 20 ч интоксикации) уровень цитохрома b_5 продолжает повышаться, что, возможно, связано с гиподинамическим состоянием животных под воздействием ОМИ. Уровень суммарной фракции мембранных цитохромов b_{558} , и цитохрома $b_{558}IV$ несколько снижается, оставаясь, однако, выше нормы. В балансе эритроцитарных цитохромов снижение уровня цитохрома $b_{558}IV$ и суммарной фракции b_{558} компенсируется повышением уровня цитохрома $b_{558}III$, при этом уровень сывороточных цитохромов $b_{558}I$ и $b_{558}II$ практически не меняется. Динамика изменения уровня антиоксидантных металлопротеинов в ОГ-2 несколько отличается от таковой в ОГ-1. Так, уровень ЦП уменьшается вдвое, а содержание ТФ заметно повышается, и на этом фоне уровень СОД и каталазы остается практически неизменным. В ОГ-2 значительно снижается уровень супрола с заметным повышением его O_2^- -продуцирующей активности, что, возможно, связано с активированием супрола ионами $Cu(II)$ *in vitro* и *in vivo*. Это имеет место при введении в организм ионов не только $Cu(II)$, но и $Fe(III)$ [3].

Понижение уровня супрола и повышение его O_2^- -продуцирующей активности, видимо, связано с перекисным окислением собственных фосфолипидных остатков не только ионами $Cu(II)$, как это свойственно многим липопротеинам сыворотки, но и автокаталитически продуцированными супероксидными радикалами. Это вызывает уменьшение стабильности супрола, особенно если учесть, что в процессе липидной пероксидации супрола могут участвовать и гидроксильные радикалы, которые образуются реакцией Фентона [11]. Снижение уровня супрола может быть связано с повышенным расходом на энергетические нужды. Под воздействием O_2^- , $HO^\bullet$ и H_2O_2 заметно нарушается функция эритроцитарных мембран, при этом фактически нарушается и физиологическое равновесие новых функционально-структурных компонентов этих мембран, каковыми являются цитохромы b_{558} . Последние являются NADPH-зависимыми, O_2^- -продуцирующими ферментными системами [4], подобно тем цитохромам b_{558} , которые локализованы в мембранах различных биобразований, включая и мембраны лимфоцитов и лейкоцитов различного типа [11]. Увеличение уровня цитохрома $b_{558}III$ (и других цитохромов типа b) приводит к соответствующему увеличению продуцирования O_2^- , H_2O_2 и $HO^\bullet$, которые являются токсическими соединениями для различных биосистем [5] (включая мембранные цитохромы b_{558} и эритроцитарные мембраны), вызывая окислительное повреждение [12,15,17]. В ходе ферментативного дисмутирования O_2^- генерируется перекись водорода, а при расщеплении последней образуется $HO^\bullet$. Увеличение по сравнению с нормой уровня ЦП как фактора острой фазы есть естественная реакция организма на нейтрализацию (связывание) $Cu(II)$ при ОМИ, что отмечается и другими исследователями [10,16]. Интересно отметить, что при ОМИ независимо от продолжительности интоксикации уровень каталазы снижен и почти не меняется суммарный уровень сывороточных цитохромов $b_{558}I$ и $b_{558}II$, которые являются основными защитными факторами биосистем плазмы не путем расщепления перекиси водорода, как это свойственно каталазе, а путем экранирования действий этой перекиси [6]. Видимо, при ОМИ особых нарушений метаболизма перекиси водорода не происходит, хотя наблюдается некоторое понижение уровня каталазы в эритроцитах, что может быть результатом повышенного расходования и инактивирования каталазы активными формами кислорода. При ОМИ наблюдается и нарушение метаболизма

железа, в результате чего происходит заметное повышение уровня ТФ в сыворотке крови, особенно при 20 ч медной интоксикации. Эти особенности количественных характеристик оксидативного повреждения при ОМИ необходимо учитывать при использовании Cu(II) в качестве лечебного препарата.

Поступила 14.08.00

ԱՐՅԱՆ ՀԱԿԱՕՔՍԻԳԱՆՏԱՅԻՆ ԵՎ ՊՐՈՕՔՍԻԳԱՆՏԱՅԻՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵՏԱԿԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ԷՆԴՈԳԵՆ ՄԱԿԱՐԳԱԿԻ ԲՆՈՒԹԱՐԱՎԱԿԱՆ ՏԵՂԱՇԱՐԺԵՐԸ Cu(II) ԻՈՆՆԵՐՈՎ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՍՈՒՐ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Գ.Ռ.Օքսուզյան, Մ.Ա.Սիմոնյան, Ս.Ս.Ալեքսանյան, Ռ.Մ.Սիմոնյան, Մ.Ա.Բաբայան

Որոշվել է արյան պրոօքսիդանտային (ցիտոքրոմներ b_5 , $b_{558}\text{I-IV}$ և սուպրոլ) և հակաօքսիդանտային ազդեցության (Cu, Zn-SOD , կատալազ, ցերուլոպլազմին և տրանսֆերրին) մետաղապրոտեինների բնութագրական քանակական փոփոխությունները առնետներին ներդրվածային ներարկումով Cu(II) իոններով (30 մգ/կգ) սուր թունավորման դեպքում թունավորումից 3 և 20 ժ հետո: Թունավորման փուլությունից կախված նշված մետաղապրոտեինների էնդոգեն քանակը հիմնականում փոփոխվում է ոչ նույն օրինաչափությամբ: 3 ժ փուլությամբ թունավորման հետևանքով ցիտոքրոմ $b_{558}\text{III}$, սուպրոլի և կատալազի նվազման ֆոնի վրա մնացած մետաղապրոտեինների մակարդակը հիմնականում աճում է (25-40%) կամ գործնականորեն մնում է անփոփոխ (Cu, Zn-SOD , ցիտոքրոմներ $b_{558}\text{I}$ և $b_{558}\text{II}$): 20 ժ փուլությամբ թունավորման հետևանքով նշված փոփոխությունների ամպլիտուդները որոշակիորեն փոքրանում են՝ էապես աճում է ցիտոքրոմ $b_{558}\text{III}$ քանակը և շարունակում է նվազել սուպրոլի մակարդակը, բարձրանալով սուպրոլի O_2^- -գոյացնելու ակտիվությունը:

Այսպիսով սուր պղնձային թունավորման փուլությունից կախված օրգանիզմի ադապտացիոն մեխանիզմների արձագանքը ընդդեմ արյան մեջ հարուցված օքսիդատիվ սթրեսի նույնափափ է:

PECULIAR SHIFTS OF ENDOGENOUS LEVEL OF BLOOD METALLOPROTEINS OF ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT ACTION AT ACUTE INTOXICATION OF RATS BY Cu(II) IONS

G.R.Oxuzyan, M.A.Simonyan, S.S.Alexanyan, R.M.Simonyan, M.A.Babayan

The characteristic changes of the endogenous level of prooxidant (cytochromes b_5 , $b_{558}\text{I-IV}$ and suprol) and antioxidant action (Cu, Zn-SOD , catalase, ceruloplasmin, transferrin) metalloproteins, as well as the O_2^- -producing activity of suprol at acute intoxication have been studied in rats, intraperitoneally injected by Cu(II) in the dose of 30 mg/kg, 3 and 20 hrs after intoxication. It has been established that the levels of indicated metalloproteins are changed not identically. After 3 hrs intoxication it was observed a decrease in the amount of cytochrome $b_{558}\text{III}$, suprol and catalase, the levels of other metalloproteins on the whole were increased (25-40%) or actually were not changed (Cu, Zn-SOD , cytochromes $b_{558}\text{I}$ and $b_{558}\text{II}$). After 20 hrs of intoxication the amplitudes of these changes were different and the amount of cytochrome $b_{558}\text{III}$ was essentially increased. The level of suprol continued to decrease, although its O_2^- -producing activity increased.

Thus, depending on the duration of acute copper intoxication the response of the adaptive mechanisms against oxidative damage in the blood appears to be different.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оксюзян Г.Р., Симонян М.А., Алексанян С.С. и др. *Вопр.теор.клин.мед.*, 1999, 2, с. 65.
2. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. *Промышленная собственность* (официальный бюлл.) Патентного управления РА, Ереван, 1997, с. 34.
3. Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М. и др. *Биол. ж. Армении*, 1999, 1, с. 18.
4. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. *Биохимия*, 1995, 60, с. 1997.
5. Симонян М.А. *Афтореф.докт.дис.*, Ереван, 1996.
6. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М. и др. *Актуальные вопр. воен. медицины*. Ереван, 1999.
7. Cunningham J.J., Lydon M.K., Enerson R., Harmatz P.R. *Nutrition*, 1996, 12, 83.
8. Ehrenwald E., Chisolm G.M., Fox P.L. *J.Clin.Invest.*, 1994, 93, p. 1493.
9. Irato P., Sturniolo G.C., Giacom G. *Biol.Trace.Elem.Res.*, 1996, 5t, p. 87.
10. Iskra M., Majewski W. *Int.J.Clin.Lab.Res.*, 1999, 29, p. 64.
11. Kanegasaki S. *Hum.Cell*, 1993, 6, p. 245.
12. Kkoev V.R. *Biochim.Biophys.Acta*, 1998, 1371, 284.
13. Koizumi M., Suzuki K., Inoue T., Gutteridge J.W., Taniguchi N. *Free Radical Res.*, 1998, 28, p. 441.
14. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1972, 46, p. 849.
15. Rosen G.M., Barber M.J., Raukman E.J. *J.Biol.Chem.*, 1983, 258, p. 2225.
16. Sobol G., Pyda E. *Pneumon. Allergol.Pol.*, 1995, 63, p. 378.
17. Zee J., Dubelmon T.M., Steveininck J. *Biochim.Biophys.Acta*, 1985, 818, p.38.