

Количественные изменения металлопротеинов и малонового диальдегида в тканях крыс после острой интоксикации ионами Fe(III)

Г.Р. Оксужян, Р.М. Симонян, М.А. Бабаян, М.А. Симонян

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

Институт биохимии им Г.Х. Бунятына НАН РА,

375014 Ереван, Севака 5/1

Ключевые слова: металлопротеины, ткани, острая интоксикация, ионы железа (III), оксидативное повреждение

Ионы железа являются важными компонентами активных центров многих биосистем (в частности, цитохромы b_{558} , b_5 , P_{450} , С, гемоглобин, ферменты и т. д.), ответственными за перенос молекулярного кислорода к клеткам и за протекание окислительно-восстановительных процессов с участием активных форм кислорода (АФК) [9]. При различных проявлениях оксидативного стресса часто происходит и нарушение метаболизма железа с накоплением в различных биосистемах "свободных" ионов Fe(II), которые инициируют образование крайне токсических для биосистем гидроксильных радикалов [8]. Гидроксильные радикалы деградируют ДНК, липиды мембран, карбогидраты [2,14], вызывая оксидативные повреждения различных биосистем [13,16,17] с подавлением функции рецепторов трансферрина [11]. Ионы Fe(III) вызывают и усиливают перекисное окисление липопротеинов сыворотки различных плотностей и активируют супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол (как *in vitro*, так и *in vivo*) [3].

Целью работы является комплексное определение количественных сдвигов металлопротеинов-регуляторов метаболизма АФК и малонового диальдегида (МДА) в крови и в других тканях крыс после острой интоксикации ионами Fe(III) в различных дозах.

Материал и методы

Белые крысы-самцы массой 180–200 г, содержащиеся на полноценном рационе в течение 30 дней до начала эксперимента, были разделены на 3 группы (по 10 в каждой). Животные I опытной группы (ОГ-1) получали внутривенно Fe(III) в виде раствора $FeCl_3$ по 50 мг/кг массы животного. Животные II

опытной группы (ОГ-2) получали по 100 мг/кг Fe(III). Контрольные крысы получали физраствор в аналогичных объемах и сроках. Животные всех групп были декапитированы под легким эфирным наркозом через 4 суток после введения железа или физраствора. Кровь животных каждой группы стабилизировали натрий-оксалатным буфером. Одновременно были выделены ткани животных (печень, сердце, мозг).

Металлопротеины прооксидантного действия (цитохром b_5 получали из растворимой фракции эритроцитов; суммарную фракцию цитохромов $b_{558}I$ и $b_{558}II$ – из сыворотки крови; суммарную фракцию цитохромов $b_{558}III$ и $b_{558}IV$ – из мембран эритроцитов; супрол-супероксидпродуцирующий липопротеин – из сыворотки крови) и металлопротеины антиоксидантного действия (Cu,Zn-СОД и каталазу выделяли из растворимой фракции эритроцитов; церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) – из сыворотки крови) одновременно были выделены и очищены по разработанному нами способу [4] с некоторыми видоизменениями [5] во избежание использования детергентов при солубилизации эритроцитарных мембранных гемопропротеинов, т.к. детергент снижает стабильность цитохромов b_{558} [6].

Отдиализованные белковые фракции сыворотки, эритроцитарных мембран и плазматической части эритроцитов подвергали ионообменной хроматографии на отдельных колонках с целлюлозой DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексом DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) с последующей гельфильтрацией на биоэле P-100.

Супероксиддисмутазу (СОД) из гомогенатов тканей (печень, сердце, мозг) получали способом [7] с введением некоторых изменений в целях получения также каталазы и цитохрома С. В частности, после гомогенизации тканей в 0.04 М калий-фосфатном бу-

фере (КФБ), осаждения нерастворимых частей центрифугированием и диализа надосадочных растворов их подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52 и KM-52 и сефадексе DEAE A-50. Продукт аскорбатзависимой липидной пероксидации – МДА в гомогенатах тканей определяли методом Влодимира и сотр. [1].

Количество полученных металлопротеинов определяли по величине плотности максимальных оптических поглощений, характерных для цитохромов b_{558} I–IV при 530 нм, супрола – 430 нм (слабое плечо), ЦП – 610 нм, ТФ – 470 нм. СОД активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли общеизвестным методом нитротетразолиевого синего (НТС), рассчитав процент ингибирования или процент прироста образования формазана при (560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами в присутствии СОД и супрола соответственно. Катализную активность фракций определяли перманганатометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (N) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°. Удельная активность приведенных ферментов определялась в расчете на 1 мл эритроцитов или на 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 (2х30 см, 4х20 см, 2х85 см).

Опыт повторялся четырехкратно. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

В зависимости от дозы Fe(III) динамика изменения эндогенных уровней металлопротеинов анти- и прооксидантного действия – регуляторов метаболизма АФК в крови и других тканях (печень, сердце, мозг), а также МДА ощутимо различается.

По сравнению с показателями животных контрольной группы в ОГ-1 наблюдается повышение уровня металлопротеинов прооксидантного действия: суммарной фракции сывороточных цитохромов b_{558} I и b_{558} II; суммарной фракции эритроцитарных мембранных цитохромов b_{558} III и b_{558} IV и, особенно, супрола (таблица). При этом O_2^- -продуцирующая активность супрола несколько снижается. На этом фоне происходит повышение уровней белков острой фазы – ЦП, незначительно – уровня ТФ и Cu,Zn-СОД. В то же время при двукратном увеличении вводимой дозы FeCl₃ снижение уровня металлопротеинов проокси-

дантного действия цитохромов b_5 , b_{558} I и b_{558} II компенсируется повышением уровней цитохромов b_{558} III и b_{558} IV, а также супрола (O_2^- -продуцирующая активность супрола немного возрастает). В ОГ-2 уровни ТФ, СОД и каталазы приближаются к норме, а уровень ЦП остается все еще повышенным. Последний факт свидетельствует о том, что организму необходим соответствующий повышенный уровень ЦП, обладающий наряду с O_2^- -вылавливающим и медь-связывающим-транспортирующим свойством и ферроксидазной активностью

ЦП

(Fe(II) → Fe(III) [10]) и предотвращающий токсичные для биосистем Fe(II) в менее токсичные Fe(III). В ОГ-2 по сравнению с ОГ-1 понижение уровня ТФ возможно связано с повышением его расхода в процессе улавливания Fe(II). Из приведенных в таблице данных видно, что, если суммарный уровень металлопротеинов крови прооксидантного действия превышает уровень антиоксидантных металлопротеинов в 3.3 раза (налицо явный дисбаланс между продуцирующими и утилизирующими АФК металлопротеинами, в результате чего повышается угроза увеличения уровней O_2^- и их производных, которые могут усилить оксидативное повреждение), то в ОГ-2 уровни металлопротеинов анти- и прооксидантного действия почти одинаковы (нет дисбаланса).

Отсюда следует, что в ОГ-1 при относительно пониженных дозах ионов Fe(III) оксидативное повреждение компонентов крови намного больше, чем при повышенных дозах Fe(III) в ОГ-2. Этот, на первый взгляд, непонятный эффект, видимо, связан с тем, что при повышенных дозах защитно-адаптационные механизмы организма в ОГ-2 действуют более эффективно, чем в ОГ-1, согласно закону: "сильное воздействие создает адекватное противодействие".

Таким образом, в зависимости от доз Fe(III) патогенетические механизмы, связанные с нарушением физиологического равновесия между металлопротеинами крови анти- и прооксидантного действия различаются. Изменения уровней СОД, каталазы, цитохрома С и МДА в тканях печени, сердца и мозга в ОГ-1 и ОГ-2 в основном различаются. В ОГ-1 понижение уровней СОД, и особенно каталазы, способствует повышению уровня МДА. При этом повышается уровень переносчика электронов в дыхательной цепи митохондрий – цитохрома С.

В ОГ-2 уровень каталазы заметно возрастает, что приводит к снижению уровня липидной пероксидации, вызванной, вероятно, гидроксильными радикалами, образовавшимися при воздействии Fe(II) с перекисью водорода [8]. Повышение уровня цитохрома С в ОГ-1 и снижение в ОГ-2, видимо, связано с интенсификацией переноса электрона к молекулярному кислороду с образованием АФК различного характера. Это, в свою очередь, вызывает расходование антиок-

сидантных металлопротеинов и их дезактивирование активными формами кислорода [12,15].

Фактически печеночная ткань энергичнее реагирует при повышенных дозах Fe(III). В сердечной ткани окислительное повреждение вызвано уменьшением содержания ключевых антирадикальных защитных ферментов СОД и каталазы (в ОГ-1 и ОГ-2 оно практически происходит адекватным образом), хотя в ОГ-2 СОД-активность продолжает несколько снижаться. В результате этого уровень МДА несколько выше в гомогенатах сердечной ткани в ОГ-2. Содержание цитохрома С в сердечной ткани в обеих опытных

группах ощутимых изменений не претерпевает. Вероятно, последнее связано с повышенным удельным содержанием цитохрома С в сердечной ткани по сравнению с его содержанием в других тканях.

В ткани целого мозга в ОГ-1 и ОГ-2 ионы железа практически не вызывают ощутимого снижения уровня СОД и каталазы, уровень цитохрома С снижается, в особенности в ОГ-2, а уровень МДА снижается в ОГ-1 и не изменяется в ОГ-2. Это свидетельствует о сравнительно большой инертности мозговой ткани при интоксикации Fe(III) в различных дозах.

Таблица

Относительные изменения эндогенных уровней (%) металлопротеинов и МДА в тканях крыс при острой интоксикации ионами Fe(III)

Металлопротеины	ОГ-1 50 мг/кг (+10мг FeCl ₃)	ОГ-2 100 мг/кг (+20мг FeCl ₃)
КРОВЬ		
Цитохром b ₅	+100 ± 8.7 (p<0.03)	-57.2±6.0
ΣЦит. b ₅₅₈ I+II	+60±7.1	-15±1.9
ΣЦит. b ₅₅₈ III+IV	+66.7±6.5	+133.4±13.1 (p<0.01)
Супрол	+133.3±11.1 (p<0.01)	+66.7±5.9
O ₂ ⁻ -продуц. активн. супрола	-10.0±2.1	+7.5±1.6
ЦП	+100±7.7	+100±9.1 (p<0.04)
ТФ	+36.3±4.1	+8.3±1.1
Cu,Zn-СОД	+8.9±1.2	+3.7±0.9
Каталаза	-40.2±5.5	нет изм.
ПЕЧЕНЬ		
СОД	-4.4 ± 1.2	-12.8±1.2
Каталаза	-60.1 ± 5.4 (p<0.02)	-14.4±1.1
Цитохром С	+29.4 ± 3.9	+11.7±2.1
МДА	+27.3 ± 4.1	+13.5±2.5
СЕРДЦЕ		
СОД	-29.8±3.1	-40.0±4.4 (p<0.01)
Каталаза	-40.2±5.2 (p<0.02)	-42.4±4.9
Цитохром С	-8.4±0.9	нет изм.
МДА	+25.8±3.0	+31.4±2.8
МОЗГ		
СОД	-1.6±0.2	-6.2±0.8
Каталаза	нет изм.	нет изм.
Цитохром С	-35.8±4.0	-88.9±6.6 (p<0.01)
МДА	-20.0±2.9	нет изм.

Примечание: контрольные показатели принимаются за 100% (n=4, p<0,005)

Можно констатировать, что при интоксикации ионами Fe(III) оксидативному повреждению, вызванному нарушением физиологического равновесия между металлопротеинами анти- и прооксидантного дейст-

вия и липидной пероксидацией, более всего подвержены кровь, печень и сердце, а защитные системы мозга предотвращают такое оксидативное повреждение.

Поступила 28.08.01

Ամենամեծի հյուսվածքներում մետաղապրոտեինների և մալոնային դիալդեհիդի քանակական փոփոխությունները Fe(III) խոնկերով սուր թունավորումից հետո

Գ.Ռ.Օկսուզյան, Ռ.Մ.Սիմոնյան, Մ.Ա.Բաբայան, Մ.Ա.Սիմոնյան

Ամենամեծի մոտ Fe(III) խոնկերի ներդրվային մեծարկումով (50 մգ/կգ և 100 մգ/կգ) սուր թունավորման 4-րդ օրը դիտվել է արյան մեջ, լյարդում, սրտում և ուղեղում տեղակայված թթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակությունը կարգավորող մետաղապրոտեինների և մալոնային դիալդեհիդի ոչ նմանատիպ քանակական փոփոխություններ, դրանց ֆիզիոլոգիական հաշվեկշռի բնութագրական շեղումներով հանդերձ:

Ֆիզիոլոգիական հաշվեկշռի այդ շեղումները առավել զգալի են արյան մեջ, լյարդում և սրտում, քան ուղեղում: Fe(III) խոնկերի քանակների աճին զուգընթաց աճում է օրգանիզմի ադապտացիոն մեխանիզմների հակազդեցությունը՝ "մեղմելու" համար հաշվեկշռի նշված շեղումները, նվազեցնելով թթվածնի ակտիվ միացությունների կողմից նշված կենսահամակարգերում օքսիդատիվ սթրեսային վիճակը:

The quantitative changes of metalloproteins and malonic dialdehyde in tissues of rats after intoxication by Fe(III)

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

Depending on the dose of intraperitoneally injected Fe (III) (50 mg/kg and 100 mg/kg) on the 4th day of the intoxication nonadequate quantitative changes of the levels of metalloproteins – regulators of metabolism of reactive oxygen species, with the corresponding shifts of peculiar physiological equilibrium in the blood, liver, heart and brain are observed. These shifts of the

physiological balance are more expressed in the blood, liver and heart, than in the brain. At the increase in the dose of Fe(III) a corresponding increase in the counteraction of the adaptive mechanisms of organism takes place for "moderation" of these shifts and for reduction of the oxidative stress in these biosystems.

Լիտերատուրա

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* ПОЛ в биологических мембранах. М., 1972.
2. *Кухтина Е.Н., Глушенко Е.Н.* Биохимия, 1996, 61(6), с. 993.
3. *Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А.* Биох. ж. Армении, 1999, 52(1), с. 18.
4. *Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В.* Офици. бюл. Арм. патент, 1997, 1(3), с.34.
5. *Симонян Г.М., Симонян М.А., Григорян Г.Г., Симонян Р.М.* Изобретение N P20000021, Арм. патент, 2001.
6. *Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М.* Биохимия, 1995, 60(12), 1977.
7. *Симонян М.А.* Открытия Изобретения (СССР), 1988, 28, с.107, АС 1413139.
8. *Gutteridge J.M.C.* FEBS Lett., 1984, 172(2); 245.
9. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Arch. Biochem. Biophys., 1986, 246(2): 501.
10. *Harris E.D.* J. Trace Elem. Exp. Med., 1994, 7(2); 69.
11. *Khumalo H., Gomo Z.A., Moyo V.M. et al.* Clin. Chem., 1998, 44(1): 40.
12. *Lardinols O.M.* FEBS Lett., 1995, 22(3): 251.
13. *Mc Cord J.M.* Semin. Hematol., 1998, 35(1): 5(69 ref.).
14. *Quinlan G.J., Gutteridge J.M.C.* Free Rad. Biol. Med., 1988, 5(5-6): 341.
15. *Simonyan M.A., Nalbandyan R.M.* Biochem. Biophys. Acta, 1979, 583(3): 279.
16. *Staubli A.* Am. J. Physiol., 1998, 274(6 Pt.1): G1031.
17. *Willmore J., Hiromatsu M., Kochi H., Mori A.* Brain Res., 1983, 277(2): 393.