

Цитохром b_{558} из сыворотки венозной крови и дисбаланс между уровнями металлопротеинов крови пациентов с острым лимфобластическим и миелобластическим лейкозом

Г.М.Симонян

Институт биохимии им.Г.Х. Бунятына НАН РА

375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1

Ключевые слова: лимфобластический и миелобластический лейкоз, цитохром b_{558} , кровь, металлопротеины, супероксидный радикал

Участие активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, супероксидных радикалов (O_2^-) в метаболических процессах роста и гибели опухолевых клеток можно считать доказанным фактом [1,12]. Исходя из этого, большое значение имеет изучение состояния металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК крови, в частности, при лейкемии различного характера. При острой лейкемии у человека наблюдается понижение супероксиддисмутазной (СОД) активности крови, а увеличение этой активности приводит к определенной нормализации уровня гемоглобина и лейкоцитов [16]. С другой стороны, в культуре клеток фагоцитирующих лейкоцитов (U 937) при лейкемии под воздействием противораковых препаратов наблюдается стимулирование продуцирования O_2^- с участием цитохрома b_{558} [11]. Большинство противораковых препаратов продуцирует O_2^- , а интрацеллюлярная СОД играет защитную роль для лейкемических клеток человека при ионизирующей радиации [15]. Понижение уровня антирадикальных защитных систем (СОД, каталаза, глутатион пероксидаза) в лимфоцитах приводит к оксидативному повреждению гидроксильными радикалами лимфоцитарной ДНК при лимфобластическом лейкозе у малолетних детей [13,14]. Однако у взрослых при остром лимфобластическом лейкозе активность СОД в лейкоцитах выше, а в сыворотке крови ниже [8]. При лейкозе на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов уровень глутатиона остается неизменным [9]. Исходя из того, что продуцирующие и утилизирующие АФК биосистемы действуют одновременно и взаимосвязанно, становится необходимым проведение соответствующих исследований для одновременного выявления количественных характеристик этих систем, включая и новые металлопротеины крови прооксидантного действия при более распространенных формах рака крови – лимфобластическом и миелобластическом лейкозе, что даст возможность по-новому оценить и

углубить имеющиеся молекулярные механизмы патогенеза этих заболеваний, что и является целью работы.

Материал и методы

Металлопротеины крови антиоксидантного действия – МАД (Cu,Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин – ЦП и трансферрин – ТФ из сыворотки крови) и металлопротеины крови 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 – супрол из сыворотки крови) одновременно выделяли и очищали из венозной крови (по 20 мл) больных (мужчины и женщины в возрасте 40–52 лет) с острым лимфобластическим лейкозом (12 чел.) и миелобластическим лейкозом (10 чел.) по разработанному нами способу [2]. При этом эритроцитарные мембранные цитохромы b_{558} выделяли [3], исключая использование детергента (детергент заметно снижает стабильность этих гемопротеинов и затрудняет их исследование). Отдialiзованные белковые фракции сыворотки эритроцитарных мембран и растворимой 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 биоцеле P-100 ("Reanal", Венгрия). Количество полученных металлопротеинов определяли по величине плотности максимальных оптических поглощений, характерных для цитохрома b_5 при 525 нм, цитохромов $b_{558}I-IV$ при 530 нм, супрола – при 430 нм (слабое плечо), ЦП – при 610 нм, ТФ – при 470 нм. Супероксиддисмутазную активность фракций и супероксидпродуцирующую активность супрола опре-

деляли нитротетразолиевым синим (НТС) [4], рассчитав проценты ингибирования или прироста образования формазана (при 560 нм) при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами в присутствии СОД или супрола соответственно. Каталазную активность фракций определяли перманганометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (М) определенным количеством фракции за 1 мин при 20°C. Удельная активность приведенных ферментов определялась в расчете на 1 мл эритроцитов или 1 мл сыворотки. Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре "Specord UV VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. В ходе получения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К-24 и К-70 (Германия), а также стеклянные колонки с фильтрами различных размеров (2x30, 4x20, 2x70 см). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Направленность изменений эндогенных уровней МАД и МПД при лимфобластическом лейкозе (ЛБЛ) и миелобластическом лейкозе (МБЛ) была практически одинаковой. При этом из МПД ощутимо повышен только уровень цитохрома b_5 . Это может быть результатом снижения обычной подвижности больных (такой эффект наблюдается при гипокинезии в эксперименте). Уровень же остальных МПД и O_2^- -продуцирующая активность супрола снижены при ЛБЛ и МБЛ (таблица). При указанных заболеваниях из МАД только уровни ЦП и ТФ несколько повышены, что в

Таблица

Относительные изменения (%) эндогенных уровней МПД и МАД в крови больных при остром ЛБЛ (ОГ-1) и МБЛ (ОГ-2)

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2
Цитохром b_5	+54,3 ± 6,4 P<0.01	+67,4 ± 6,9 P<0.01
Сумма цитохромов b_{558} из мембран эритроцитов	-37,2 ± 5,1	-32,9 ± 4,7
Супрол	-43,4 ± 3,2 P<0.04	-54,2 ± 7,1 P<0.03
O_2^- -продуцирующая активность супрола	-23,6 ± 2,9	-27,5 ± 3,4
ЦП	+34,5 ± 4,6 P<0.01	+41,4 ± 5,4 P<0.01
ТФ	+25,4 ± 3,6	+21,8 ± 3,1
СОД	-19,4 ± 2,6	-17,5 ± 1,9
Каталаза	-44,2 ± 4,0	-57,9 ± 7,2

основном компенсирует снижение СОД и каталазы. Суммарный уровень МПД более низкий по сравнению с МАД ОГ-1 и ОГ-2 и составляет 26,3% для МПД, 4,7% для МАД в ОГ-1, а для ОГ-2 – 19,7 и 12,0% соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что при МБЛ за счет такого повышения уровня МАД организм имеет сравнительно большую защитную систему, чем при ЛБЛ. Таким образом, существует определенное нарушение физиологического уровня МАД и МПД при острой ЛБЛ и МБЛ.

Впервые из сыворотки венозной крови человека при острых ЛБЛ и МБЛ получен цитохром b_{558} , который до сих пор выделялся только из сыворотки плацентарной крови женщин и сыворотки крови мелких млекопитающих [5]. Однако в сыворотке крови здорового человека или при заболеваниях различного характера независимо от пола цитохром b_{558} не обнаруживался [6]. По характерным физико-химическим свойствам цитохрома b_{558} из сыворотки крови людей при ЛБЛ и МБЛ в основном не отличается от цитохрома b_{558} из сыворотки плацентарной крови человека (они имеют аналогичную кислотность, молекулярную массу и оптические спектральные поглощения при 530 нм/α-полоса/, 560 нм/β-полоса/ и 415 нм /γ-полоса/ в окисленном состоянии и 558 нм /α-полоса/ в восстановленном состоянии. Однако в отличие от цитохрома b_{558} из сыворотки плацентарной крови человека вместо поглощения при 360 нм, цитохром b_{558} из сыворотки крови при ЛБЛ и МБЛ имеет поглощение при 368 нм (рис.).

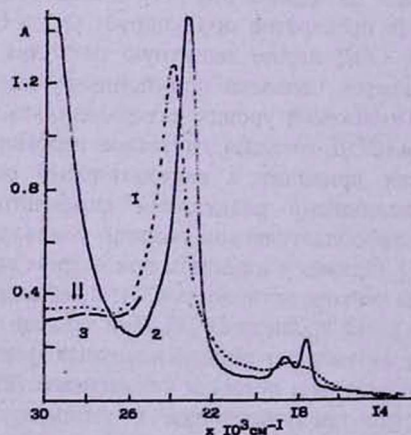


Рис. Оптические спектры поглощения цитохрома b_{558} : 1 – из сыворотки венозной крови ЛБЛ или МБЛ (из 10 мл сыворотки объем растворов цитохрома b_{558} составляет по 4 мл); 2 – это 1 после восстановления дитионитом натрия; 3 – из сыворотки плацентарной крови человека (показана только часть спектра, остальная часть спектра совпадает со спектром 1).

Наличие цитохрома b_{558} в крови может служить тонким и новым маркером при остром ЛБЛ и МБЛ. С другой стороны, с появлением цитохрома b_{558} в сыворотке крови несколько ослабляется дисбаланс между МПД и МАД и обеспечивается защита биосистем плазмы от воздействия перекиси водорода, эффект которого предотвращается сывороточным цитохромом b_{558} [7]. Известно, что цитохромы b_{558} , локализованные в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов,

лимфоцитов и т.д., являются важными компонентами иммунной системы организма [10] как мощные генераторы АФК, в первую очередь, O_2^- , которые и нейтрализуют антигены различного характера. Не исключается, что с появлением в сыворотке крови цитохрома b_{558} при ЛБЛ и МБЛ стимулируются защитные механизмы организма человека, как ответная реакция при раке крови.

Поступила 15.03.02

Սուր լիմֆոբլաստային և միելոբլաստային լեյկոզով հիվանդների երակային արյան շիճուկից ստացված ցիտոքրոմ b_{558} -ը և մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների հաշվեկշռի շեղումը արյան մեջ

Գ.Մ.Սիմոնյան

Առաջին անգամ սուր լիմֆոբլաստային լեյկոզով և միելոբլաստային լեյկոզով հիվանդների երակային արյան շիճուկից ստացվել է ցիտոքրոմ b_{558} -ը, որը իրեն բնորոշ ֆիզիկաքիմիական հատկանիշներով հիմնականում նմանվում է մարդկային ընկերային արյան շիճուկից ստացված ցիտոքրոմ b_{558} -երին: Այդ հիվանդությունների ժամանակ առկա է բնութագրական խախտում արյան հակա- և պրոօքսիդան-

տային գործողության մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակների միջև, ինչը պայմանավորված է պրոօքսիդանտային գործողության մետաղապրոտեինների գոմարային մակարդակների պակասով: Ենթադրվում է, որ երակային արյան շիճուկում ի հայտ եկած ցիտոքրոմ b_{558} -ը մեղմացնում է հաշվեկշռի առկա խախտումը նշված հիվանդությունների ժամանակ՝ դառնալով մոր ախտորոշիչ գործոն:

Cytochrome b_{558} from human venous blood serum at lymphoblastic and myeloblastic leukaemia and shift of the balance between the endogenous levels of blood metalloproteins

G.M.Simonyan

For the first time cytochrome b_{558} was obtained from human venous blood serum at lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. This cytochrome b_{558} on the whole had identical physico-chemical properties, which are characteristic for the cytochromes b_{558} from human placental blood serum. At these diseases peculiar shifts between the endogenous levels of the anti- and

prooxidant action metalloproteins take place, which are conditioned by a decrease in the total levels of prooxidant action metalloproteins. It is supposed that the appearance of the cytochrome b_{558} in venous blood serum decreases this disbalance. This effect can be used as a diagnostic test for these diseases.

Литература

1. Симонян М.А., Карапетян А.В., Галстян Д.А., Симонян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с.1578.
2. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Промышленная собственность (официальн.юлл. Армпатента РА).Ереван,1997, с.34.
3. Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М. Лицензия изобр.908, Армпатент РА, Ереван, 2001.
4. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А. Симонян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с.932.
5. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Биохимия, 1995, 60, с.1977.
6. Симонян М.А. Автореф.докт.дис. Ереван, 1996.
7. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р.М., Симонян М.А. Актуальные вопросы военной медицины, Ереван, 1996, с.48.
8. Abdel-Aziz A.F., El-Naggar M.M. Cancer Lett.,1997,113, p.61.
9. Arruda V.R., Salles T.S., Costa F.F., Saad S.T. Neoplasma, 1996, 43, p.99.
10. Batot G., Paclet M.H., Doussiere J. et al. Biochim. Biophys.Acta,1998, 1406, p.188.
11. Kikuchi H., Fujinawa T., Kuribayashi F. et al. J. Biochem., Tokyo, 1994, 116, p.742.
12. Oberley L.W., Oberley T.D. Alan.Liss.Inc.,1986, p. 325.
13. Sent'urker S., Karahalil B., Inal M. et al. FEBS Lett., 1997, 416, p. 286.
14. Riazantsev V.V., Kovalenko L.V., Belous A.M. Ukr.Biochem.Zh., 1996, 68, p. 92.
15. Yamaguchi S., Sakurada S., Nagumo M. Free Rad.Biol.Med., 1994, 17, p.389.
16. Zhu C.S., Zhang C.Y., Weng W.G. Chung.H ua.Chung. Lice.Tsa.Chih., 1994, 16, p.39.