

Х-облучение эритроцитарных мембран и цитохрома $b_{558}III$ *in vitro* стимулирует агрегацию последнего и снижает его O_2^- -продуцирующую и метгемоглобин-восстанавливающую активность

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

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА

375014 Ереван, ул.П.Севака, 5/1

Ключевые слова: цитохром b_{558} , эритроцитарные мембраны, метгемоглобин, феррогемоглобин, нитроксильный радикал, восстановление

Под воздействием Х-лучей (рентгеновское облучение) происходит радиолиз воды с образованием активных форм кислорода *in vitro* и *in vivo* [1–12], а ферменты антиоксидантного действия оказывают защитный эффект [18–20]. Облучение Х-лучами эритроцитов стимулирует липидную пероксидацию эритроцитарных мембран и снижает их текучесть [13, 17]. Особая роль в процессе денатурации эритроцитарных мембран придается O_2^- и H_2O_2 [13], которые наряду с нитроксильным радикалом (NO^*) являются сигнальными молекулами оксидативного повреждения [16]. При этом NO^* способен превратить оксигемоглобин (оксиНб) в метНб во внутрисосудистом пространстве головного мозга крыс, что является нежелательным фактором для кислородного гомеостаза в мозговой ткани [14, 22]. Превращение оксиНб в метНб наблюдается и в водных растворах под воздействием NO^* , образующихся из органических нитритов [10]. Однако по предварительным результатам [2], эритроцитарный мембранный цитохром $b_{558}III$ (этот белок является ФАД, NO^* -содержащим и НАДРН-зависимым O_2^- -продуцирующим гликогемопротейном), наоборот, превращает метНб в оксиНб *in vitro* [21]. С другой стороны, цитохром $b_{558}III$ очень чувствителен к воздействию H_2O_2 [3], уровень которого в самих эритроцитах при Х-облучении повышается. Однако вопрос о механизме прямого воздействия Х-лучей на состояние цитохрома $b_{558}III$ – нового функционально-структурного элемента мембран эритроцитов пока остается нерешенным.

Материал и методы

Цитохром $b_{558}III$ выделяли из человеческих эритроцитарных мембран (по 10 мл) и очищали биотехнологическим способом [8] без использования детергента в качестве солибилизирующего агента эритроци-

тарных мембранных белков [4] до электрофоретически гомогенного состояния и растворяли в 0.01 М калий-фосфатном буфере (КФБ), pH 7.4. Другую порцию эритроцитарных мембран очищали (промывали) 0.04 М КФБ до полного удаления следов Нб и элементов плазмы и смешивали с 0.1 М КФБ. Далее образцы препаратов цитохрома $b_{558}III$ и эритроцитарных мембран (по 10 мл) подвергали облучению Х-лучами (доза – 1.75, 3.5 и 5.25 Гр) *in vitro*. НАДРН-зависимую O_2^- -продуцирующую активность цитохрома $b_{558}III$ определяли нитротетразолиевым синим тестом (НТС). За единицу O_2^- -продуцирующей активности принимали то количество цитохрома $b_{558}III$, которое вызывает 50% увеличение образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). Удельная O_2^- -продуцирующая активность цитохрома $b_{558}III$ [2] была определена в расчете на 1 мл этого гемопротейна. МетНб-восстанавливающую активность цитохрома $b_{558}III$ определяли спектрофотометрическим методом путем регистрации плотности оптического поглощения оксиНб (при 555 нм), образующегося под воздействием определенного количества этого гемопротейна (поглощение метНб при 565 нм равнялось 1.0, а поглощение цитохрома $b_{558}III$ при 530 нм в реакционной смеси составляло 0.02) [21]. Эта реакционная смесь нагревалась в кварцевых кюветах при 36° в течение 4–5 ч, затем без смешивания реакционной смеси регистрировался оптический спектр поглощения оксиНб при 555 нм.

Оптические спектры поглощения и кинетические кривые образования оксиНб регистрировали на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия) с длиной оптического пробега 1 см.

Результаты и обсуждение

В отличие от необлученных эритроцитарных мем-

бран, при их облучении X-лучами часть полученного из них цитохрома $b_{558}III$ переходит в нерастворимый в 0.04 М КФБ осадок (происходит агрегация этого гемопротеина). При увеличении доз облучения повышается доля осаждаемого цитохрома b_{558} . Этот осадок растворяется при pH 9.5 (после диализа против воды с соответственной нейтрализацией этого цитохрома).

Его оптический спектр поглощения в основном совпадает со спектром цитохрома b_{558} , не осевшего при облучении X-лучами (рис.1 а,б.). Хотя отношение A_{412}/A_{530} уменьшалось в 1.5–1.7 раза, после облучения X-лучами в аналогичном режиме раствора цитохрома $b_{558}III$ *in vitro* явления самоагрегации или потери растворимости не происходит. Однако плотность

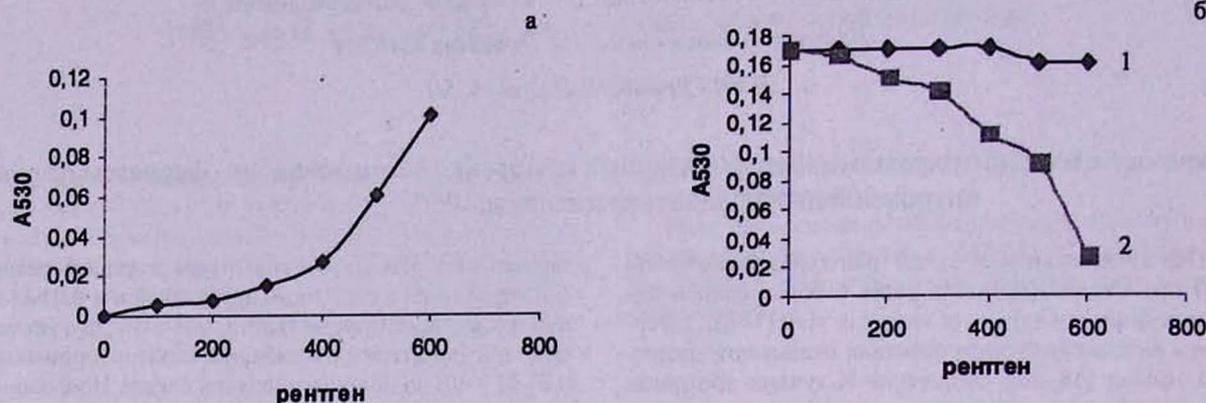


Рис.1. Плотность оптических поглощений агрегированного (а) и неагрегированного (б) цитохрома $b_{558}III$ из мембран эритроцитов после облучения этих мембран *in vitro* и растворов цитохрома $b_{558}III$ различными дозами X-лучей:

а – для цитохрома $b_{558}III$ после солиubilизации его осадка при pH 9.5 с дальнейшим диализом против воды и центрифугирования;

б – 1 – для неагрегированного цитохрома $b_{558}III$ из облученных эритроцитарных мембран;

2 – для облученного цитохрома $b_{558}III$.

поглощения полосы Core (при 412 нм) несколько снижалась (A_{412}/A_{530} уменьшалось в 1.2–1.3 раза). По-видимому, в результате радиолитического разложения воды *in vitro* образовавшаяся H_2O_2 несколько уменьшает нативность цитохрома $b_{558}III$ [3]. Усиление агрегации цитохрома $b_{558}III$ из облученных эритроцитов, возможно, связано с некоторым превращением (покраснением) цитохрома $b_{558}III$ (это белок кислого характера [7]) в цитохром $b'_{558}III$ (это белок сильнокислого характера, плохо растворимый в 0.4 М КФБ [9]). Фактически, X-лучи изменяют нативность тех групп, которые ответственны за растворимость цитохрома $b_{558}III$. Эффект превращения цитохрома $b_{558}III$ в цитохром $b'_{558}III$ наблюдается и при некоторых разновидностях злокачественных новообразований (рак грудной железы [5] и саркома-45 [6]). НАДРН-зависимая O_2^- -продуцирующая активность цитохрома $b_{558}III$ в облученных эритроцитарных мембранах (в гетерогенной фазе) снижается больше, чем при облучении препарата цитохрома $b_{558}III$ (рис.2). С другой стороны, метHb-восстанавливающая активность (скорость образования оксиHb) заметно снижена у цитохрома $b_{558}III$, полученного из облученных эритроцитов (рис.3). Можно

констатировать, что с повышением доз X-облучения из-за усиления перекисного окисления фосфолипидных остатков эритроцитарных мембран происходит снижение текучести этих мембран и увеличение агрегации цитохрома $b_{558}III$ с уменьшением его O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности, что свидетельствует в пользу нового механизма оксидативного повреждения эритроцитарных мембран при облучении X-лучами.

Способность цитохрома $b_{558}III$ восстанавливать метHb, скорее всего, связана с NO^+ , который, находясь в лигандном окружении Fe^{+3} цитохрома $b_{558}III$, может входить в комплексное соединение с метHb [5, 6] и восстанавливать его. В отличие от других NO^+ -продуцирующих систем цитохром $b_{558}III$ в эритроцитах превращает метHb в оксиHb. Это, несомненно, положительный эффект, т.к. при злокачественных новообразованиях уровень метHb в эритроцитах на 20–30% возрастает [11]. МетHb не способен переносить к клеткам молекулярный кислород, что приводит к определенной степени анемии и нарушению кислородного гомеостаза организма.

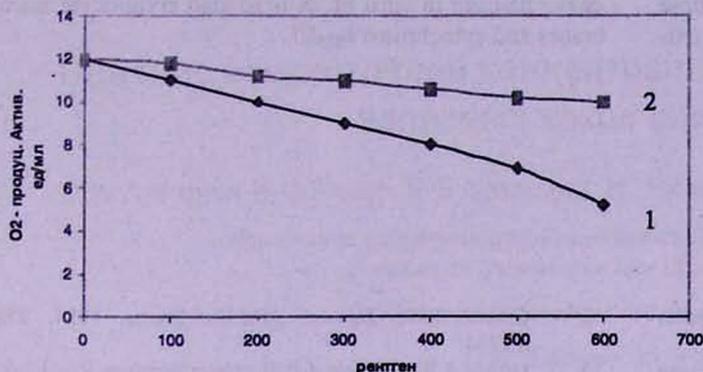


Рис.2. НАДРН-зависимая O_2^- -продуцирующая активность цитохрома $b_{558}III$:
1 – из облученных эритроцитарных мембран;
2 – из облученных растворов цитохрома $b_{558}III$

Можно заключить, что в соответствующих местах локализации эритроцитарных мембран толерантность

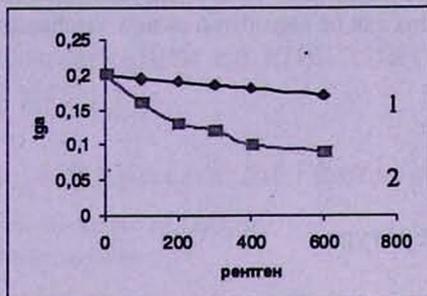


Рис.3. Скорость образования оксиHb (555 нм) после восстановления метHb под воздействием цитохрома $b_{558}III$:
1 – под воздействием водных растворов цитохрома $b_{558}III$ после облучения различными дозами X-лучей;
2 – под воздействием цитохрома $b_{558}III$, полученного из облученных различными дозами X-лучей эритроцитарных мембран

цитохрома $b_{558}III$ против X-лучей больше *in vitro*, чем *in vivo*.

Поступила 12.01.04

Էրիթրոցիտների թաղանթների և ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի *in vitro* X-ճառագայթահարումը խթանում է ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի ագրեգացումը և նվազեցնում նրա O_2^- -գոյացման և մետHb վերականգնման ակտիվությունը

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

Էրիթրոցիտների թաղանթների և ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի *in vitro* X-ճառագայթահարման դոզաների աճին գուզնթաց (1.75, 3.5, 5.25 Գր) խթանվում է ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի ագրեգացումը և նվազում նրա ՆԱԳ-ՓԻ-կախյալ O_2^- -գոյացման և մետHb վերականգնման ակտիվությունները: Ընդ որում, ջրային լուծույթում ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի դիմադրողականությունը X-ճա-

ռագայթահարման հանդեպ ավելին է, քան էրիթրոցիտների թաղանթներում:

Բերված երևույթները կարելի է դիտարկել որպես էրիթրոցիտների թաղանթների և ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի X-ճառագայթահարմամբ հարուցված օքսիդատիվ վնասման նոր մեխանիզմներ:

X-irradiation in erythrocyte membranes and cytochrome $b_{558}III$ *in vitro* results in the increase in aggregation of cytochrome $b_{558}III$ and decrease in its O_2^- -producing and methemoglobin reducing activities

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

During elevation of the dosage of *in vitro* X-irradiation (1.75, 3.5, 5.25 Gr) of erythrocyte membranes and cytochrome $b_{558}III$, increase in the aggregation and decrease in

NADPH-dependent O_2^- -producing and metHb-reducing activities of cytochrome $b_{558}III$ take place. Moreover, the tolerance to X-irradiation of cytochrome $b_{558}III$ is higher

in water solution than in erythrocyte membranes. These phenomena can be considered as new mechanisms of ox-

idative damage in vitro of X-irradiated erythrocyte membranes and cytochrome b_{558} III.

Литература

1. Гусев В.А., Брусов О.С., Панченко Л.Ф. Вопросы мед. химии, 1980, 3, с. 240.
2. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Степанян И. Э. и др. Мед. наука Армении, 2003, XLIII, 1, с.30.
3. Симосян Г.М., Григорян Г.Г., Симосян Р.М., Симосян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Ереван, 1999, с.48.
4. Симосян Г.М., Григорян Г.Г., Симосян М.А., Симосян Р. М. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N908 Армпатента. Ереван, 2001.
5. Симосян Г.М., Симосян Р.М., Бабаян М.А., Нерсисян А.К., Симосян М.А. Мед.наука Армении, 2003, XLIII, 2, с. 31.
6. Симосян Г.М., Нерсисян А.К., Симосян М.А., Галоян А.А. Сб. докл. Междунар.конф. "Биоантиоксидант". М., 2002, с.576.
7. Симосян М.А., Бабаян М.А., Симосян Г.М. Биохимия, 1995, 60(12), с.1977.
8. Симосян М.А., Симосян Г.М., Мелконян М.М. Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобретения N 341 Армпатента. Ереван, 1997.
9. Симосян М.А., Галоян А.А., Симосян Г.М., Мелконян Р.В. Докл.НАН РА, 1997, 97, с.62.
10. Balcioglu A., Watkins C.J., Maher T.J. Neurochem.Res., 1998, 23(5), p. 815.
11. Della R.F., Granata A., Broccio M., Zizilli A., Broccio G. Anticancer Res., 1995, 15, p.2089.
12. Girotti A.W., Thomas J.P. J.Biol.Chem., 1984, 259, p.1744.
13. Girotti A.W., Thomas J.P. Biochem.Biophys. Res. Com., 1984; 118(2), p. 474.
14. Gonzalez-Mora J.L., Martin F.A., Rojas-Diaz D. et al. J.Neurosci.Methods, 2002, 119 (2), p. 151.
15. Greenstock C.L. Free Radicals, Aging and Degenerative Disease. Alan R.Liss. Inc., 1986; 197.
16. Hancock J.T. Br.J.Biomed.Sci., 1997, 54(1); 38-46 (110ref.).
17. Liu P., Shen H., Zhang W. Di-San. Junui. Daxue. Xuebao, 1997, 19(4); 366.
18. Petkau A. Free Radicals, Aging and Degenerative Disease. Alan R.Liss. Inc., 19 1986; 481.
19. Petkau A., Kelly K., Chelack W.S., Garefoot C. Biochem.Biophys. Res. Com., 1976, 70(2); 452.
20. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Biochem.Biophys. Res. Com., 1979, 90(4); 1207.
21. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Babayan M.A., Simonyan M.A., Galoyan A.A. Int.Conf. "The role of the biologically active substances in the integrative activity of the organism" Collected articles, Yerevan State Med.University, 2003; p. 148.
22. Venugopalan C.S., Krautmann M.J., Holmes E.P., Maher T.J. J.Auton.Pharmacol., 1998, 18(5); 281-286.