

Различная степень рилизинга изоформ цитохрома b558 из эритроцитарных мембран и комплексообразования гемоглобина с цитохромом b558 III при сердечно-сосудистых заболеваниях

Серг.С.Алексян, Г.М.Симонян, А.С.Алексян, А.А.Степанян, М.А.Бабаян, М.А.Симонян

Институт биохимии НАН РА, Гюмрийская областная больница

375014, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/1

Ключевые слова: цитохром b558, эритроцитарные мембраны, рилизинг, сердечно-сосудистые заболевания

Одним из механизмов оксидативного стресса при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ) – острый инфаркт миокарда (ОИМ), хроническая сердечная недостаточность (ХСН), сердечная аритмия, атеросклероз и гипертония – считается отклонение от физиологического уровня антиоксидантного и прооксидантного статусов сыворотки и эритроцитов [2–4]. При этом лекарственные препараты, используемые при терапии этих заболеваний, не всегда эффективны при регулировании метаболизма активных форм кислорода (АФК). Более того, они оказывают некоторые побочные эффекты на состояние металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК [1]. Это обстоятельство необходимо учитывать при коррекции доз и периодичности приема лекарств для терапии ССЗ.

В последние 4–5 лет, с открытием 4 изоформ цит. b558III (цит. b558) эритроцитарных мембран (ЭМ), была выявлена их важная роль как новых структурно-функциональных компонентов [6]. Любое отклонение от нормы уровней этих гемопротеинов вызывает нарушение нормального функционирования ЭМ и, в конечной степени, снижение их текучести и проницаемости, что характерно различным патологическим состояниям [9], включая и ССЗ. Однако оксидативное повреждение ЭМ связано не только с количественными изменениями, в первую очередь цит. b558 (удельное содержание этой изоформы намного превосходит таковое у других изоформ этого цитохрома), но и с качественными изменениями этих гемопротеинов, которые обусловлены тремя факторами: 1) с уменьшением стабильности ЭМ происходит проникновение гемоглобина (Hb) в ЭМ и вхождение его в нестабильное комплексное соединение с цит. b558 за счет NO^+ , присутствующего в лигандном окружении железа гемовой группы цит. b558III [10,13], 2) превращением (подкислением) цит. b558III в цит. b558II сильно кислого характера, 3) изменением супероксид-продуцирующей активности цит. b558III. Эти измене-

ния свойственны некоторым злокачественным новообразованиям и X-лучевому заболеванию [5]. Количественные изменения цит. b558 ЭМ обуславливаются новым явлением – рилизингом (отщеплением) изоформ цит. b558 из ЭМ при pH 7,4 в результате инкубирования ЭМ в аэробных условиях *in vitro*. Аналогичное явление наблюдается и при различных патологических состояниях и считается новым механизмом оксидативного повреждения ЭМ с соответственным снижением их стабильности [11].

Целью работы являлось определение степени рилизинга изоформ цит. b558 из ЭМ как фактора дестабилизации ЭМ у пациентов с ССЗ.

Материал и методы

Венозная кровь (по 10 мл) была взята у доноров (10 человек) и пациентов (18 женщин и 25 мужчин) с ОИМ, ХСН, сердечной аритмией, атеросклерозом и гипертонией с давностью заболевания 2–5 лет в возрасте 31–70 лет. ЭМ промывали 0,04 М калий фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4, до полного удаления следов Hb. Далее очищенные ЭМ смешивали с 0,04 М КФБ (по 10 мл) и смесь инкубировали при 4° в течение 4 дней в условиях перемешивания. Таким образом были получены смеси ЭМ донорской крови (К) и пациентов с ОИМ (1), ХСН (2), гипертонией (3), атеросклерозом (4) и сердечной аритмией (5). Изоформы цит. b558 ЭМ получали биотехнологическим способом [8]. После инкубирования смеси ЭМ в приведенных условиях центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. В результате рилизинга часть суммарной фракции изоформ цит. b558 переходит в гомогенную фазу (супернатант 1). Не подвергшаяся рилизингу другая часть изоформ цит. b558 ЭМ солибилизируется гидролизом при pH выше 9 (супернатант 2). После диализа и удаления нерастворимых остатков суперна-

танты 1 и 2 подвергли в отдельности ионообменной хроматографии сперва на целлюлозе КМ-52, затем на целлюлозе ДЕ-52. Из колонки с целлюлозой КМ-52 цит. b558IV элюируется 0,4 М КФБ. Из ДЕ-52 цит. b558III элюируется также этим буфером. Цит. b558 нейтрального характера не задерживается на этих колонках и концентрируется лиофилизацией или методом замораживания и размораживания. Количество изоформ цит. b558 определяли путем измерения плотности максимального оптического поглощения при 530 нм. Причем были определены плотности максимального оптического поглощения в расчете на 10 мл эритроцитов и 10 мл фракции цит. b558.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия Р.

Результаты и обсуждение

ЭМ пациентов с ССЗ претерпевают неадекватные изменения. После промывания ЭМ имеют красный оттенок различной степени. Интенсивность окраски более заметна при аритмии, атеросклерозе, ОИМ, сер-

дечной недостаточности и гипертонии. После четырехдневного инкубирования проб ЭМ с указанным заболеванием при 4° in vitro при pH 7.4 наблюдается эффект рилизинга суммарной фракции цит. b558 и ЭМ в гомогенную (растворимую) фазу. Супернатанты имеют различную интенсивность окраски. Покраснение обусловлено Hb, который при ССЗ в различных количествах проникает в ЭМ. Эффект проникновения Hb отсутствует в ЭМ донорской крови (после промывания ЭМ приобретают бледно-розовый цвет). Механизм покраснения ЭМ связывается с образованием нестабильного комплекса Hb с цит. b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ), и в этом состоянии Hb уже практически не удаляется и из ЭМ. Только в ходе инкубирования ЭМ в приведенных условиях или их гидролизом [8] происходит отщепление этого комплекса от ЭМ. Проникая в ЭМ, Hb связывается с NO⁺, который присутствует в лигандном окружении цит. b558III ЭМ [7]. Оптические спектры комплекса Hb-цит. b558III имеют различные плотности максимальных оптических поглощений. Эти спектры не совпадают ни со спектрами Hb, ни с цит. b558III, а имеют «смешанную» форму (рис. 1).

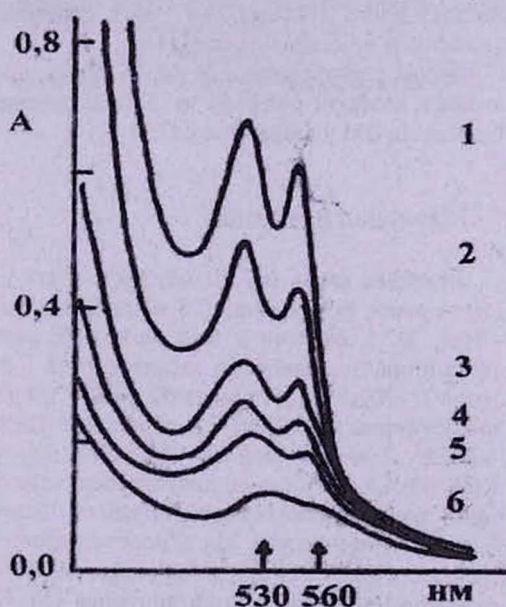


Рис. 1. Оптические спектры поглощения комплекса Hb с цит. b558 ЭМ при ССЗ после рилизинга до ионообменной хроматографии на целлюлозе КМ-52: при сердечной аритмии (1), атеросклерозе (2), остром инфаркте миокарда (3), хронической сердечной недостаточности (4), гипертонии (5), а также из ЭМ донорской крови (6). Белки были растворены в 0,04 М КФБ

Интересно и то обстоятельство, что окислительно-восстановительные способности цит. b558III в этом комплексе заметно подавлены. После восстановления цит. b558III дитионитом натрия в этом комплексе изменяется форма спектра, присущего чистому цит. b558III. Однако комплекс Hb-цит. b558III легко расщепляется при ионообменной хроматографии на целлюлозе КМ-52 и ДЕ-52. Очищенный от следов Hb цит.

b558III приобретает характерную для нативного белка форму оптического спектра поглощения (рис. 2) и окислительно-восстановительные свойства (в восстановленном состоянии появляется α -полоса поглощения при 558 нм). С другой стороны, количественный состав изоформ отщепленного и неотщепленного при pH 7,4 цит. b558III из ЭМ существенно отличается при ССЗ (таблица).

Таблица

Плотность максимального оптического поглощения изоформ цит. b558 из ЭМ в результате рилизинга и без него после инкубирования ЭМ при 4° в течение 4 дней ($P < 0,05$, $n=6$)

Изоформы цит. b558 ЭМ	Плотность максимального оптического поглощения (A_{530})					
	К	1	2	3	4	5
Цит. b558 III в результате рилизинга	$0,19 \pm 0,04$ $P < 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,004$	$0,11 \pm 0,006$ $P < 0,001$	$0,10 \pm 0,02$ $P < 0,03$	$0,14 \pm 0,01$
Цит. b558 III без рилизинга	$0,56 \pm 0,005$	$0,48 \pm 0,004$	$0,36 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,004$	$0,27 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,04$
Цит. b558 IV в результате рилизинга	$0,08 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,007$	$0,088 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,005$	$0,13 \pm 0,01$	$0,082 \pm 0,02$
Цит. b558 IV без рилизинга	$0,14 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$ $P < 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
Нейтральный цит. b558 в результате рилизинга	$1,12 \pm 0,1$ $P < 0,02$	$1,44 \pm 0,2$	$1,78 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,08$	$2,8 \pm 0,2$
Нейтральный цит. b558 без рилизинга	$1,6 \pm 0,5$	$1,09 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,1$ $P < 0,001$	$0,93 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$ $P < 0,03$	$0,84 \pm 0,1$

Примечание. 1 – острый инфаркт миокарда, 2 – хроническая сердечная недостаточность, 3 – гипертония, 4 – атеросклероз, 5 – сердечная аритмия

Причину такого отличия пока трудно определить, хотя можно предположить, что она связана со следующими факторами: 1) различными уровнями липидной пероксидации, которая подавляется препаратами антиоксидантного действия [11], приводящими к соответствующему подавлению процесса рилизинга цит. b558 из ЭМ с повышением стабильности этих мембран; 2) различием уровней нитроксильного радикала в лигандном окружении железа гемовой группы цит. b558III, что, возможно, связано с различной

NO[•]-синтазной активностью эритроцитов или ЭМ [12,13]; 3) изменениями уровня изоформ цит. b558 при ССЗ. Можно констатировать, что существующие различия стабильности ЭМ связаны с изменением уровня отщепленных и неотщепленных изоформ цит. b558 как новых и важных структурно-функциональных компонентов ЭМ. Процесс рилизинга – явление нежелательное, и этим во многом обусловлен механизм оксидативного повреждения ЭМ, в частности при

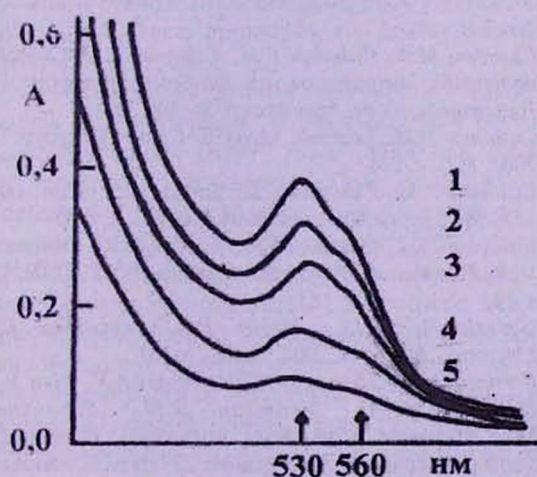


Рис. 2. Оптические спектры поглощения фракций Hb с цит b558 ЭМ при ССЗ после рилизинга и удаления следов Hb путем хроматографии на целлюлозе KM-52: 1–5 то же, что к рис. 1

ССЗ. Характерные количественные и качественные изменения уровней отщепленных цит. b558 могут быть использо-

ваны как чувствительные диагностические тесты данных ССЗ.

Поступила 09.07.04

Ցիտոքրոմ b558 իզոմերների փոքրեր աստիճանի արտազատումը էրիթրոցիտների թաղանթներից և հեմոգլոբինի – ցիտոքրոմ b558 III կոմպլեքսագոյացումը սիրտ-անոթային հիվանդությունների ժամանակ

Սերգ. Ս. Ալեքսանյան, Գ. Մ. Միմոնյան, Ա. Ս. Ալեքսանյան, Ա. Ա. Ստեփանյան,
Մ. Ա. Բաբայան, Մ. Ա. Միմոնյան

Սիրտ-անոթային հիվանդությունների (ՍԱՀ) ժամանակ (սրտամկանի սուր ինֆարկտ, խրոնիկական սրտային անբավարարություն, հիպերտոնիա, աթերոսկլերոզ, առիթմիա) հիվանդների մոտ առկա է տարբեր աստիճանի կոմպլեքսագոյացում հեմոգլոբինի ու ցիտոքրոմ b558 III-ի միջև և ցիտոքրոմ b558

III-ի արտազատում էրիթրոցիտների թաղանթներից: Ենթադրվում է, որ այս փոփոխությունները կարող են համարվել էրիթրոցիտների թաղանթների օքսիդատիվ վնասման (անկայունացման) մեխանիզմներ և օգտագործվել որպես ՍԱՀ ախտորոշիչ թեստեր:

Various degree releasing of cytochrome b558 isoforms from erythrocyte membranes and hemoglobin – cytochrome b558III complex formation at cardiovascular diseases

Serg. S. Alexanyan, G. M. Simonyan, A. S. Alexanyan,
A. A. Stepanyan, M. A. Babayan, M. A. Simonyan

Various degree releasing of cytochrome b558 isoforms from erythrocyte membranes (EM) and formation of hemoglobin–cytochrome b558III complex are observed at cardiovascular diseases (CVD) in patients (chronic heart

failure, acute myocardial infarction, hypertension, arrhythmias, atherosclerosis). These changes can be used as a factor of destabilization of EM, mechanisms of oxidative damage of EM, and as diagnostic tests for CVD.

Литература

1. Алексанян Серг.С. Биол.ж.Армении, 2004, 1–2(56), с. 57.
2. Алексанян Серг.С., Симонян Г.М., Степанян А.А., Алексанян С.С., Симонян М.А. Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга, 2004, 9(3), с. 136.
3. Алексанян Серг.С., Симонян Р.М., Степанян А.А., Симонян М.А. Мед. наука Армении, 2003, XLIII, 4, с. 62.
4. Алексанян Серг.С., Степанян А.А., Симонян М.А. Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга, 2003, 8(7), с. 164.
5. Симонян Г.М. Мед.наука Армении, 2002, XLII, 2, с. 101.
6. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Степанян И.Э., Карапетян А.В., Симонян М.А. Мед.наука Армении, 2003, XLIII, 1, с. 30.
7. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Нерсисян А.К., Симонян М.А. Мед.наука Армении, 2003, XLIII, 2, с. 31.
8. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. Армпатента № 908, 2001.
9. Симонян Р.М. Вестник МАНЭБ Санкт-Петербурга, 2003, 8(7), с. 194.
10. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А. Мед.наука Армении, 2004, XLIV, 1, с. 43.
11. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. Мед.наука Армении, 2003, XLIII, 3, с. 13.
12. Gonzalez-Mora J.L., Martin F.A., Rojas-Diaz D. J.Neurosci. Methods, 2002, 119(2), p. 151.
13. Karapetian A.V., Simonyan G.M., Miller A.F., Linn B., Babayan M.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A. Cytochrome b558 from erythrocyte membrane: Some physico-chemical properties. 227-th AGS National Meeting, Anaheim, Canada, March 28, 2004.