

## Повреждающее воздействие эпилептогена коразола на металлопротеины крови *in vitro*

Л. А. Симонян, Г. М. Симонян, А. А. Симонян, М. А. Симонян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА*

*375014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

**Ключевые слова:** кровь, металлопротеины, коразол, оксидативное повреждение

Механизмы токсического воздействия коразола *in vivo* обусловлены с повышением липидной пероксидации мембран нейронов, степенью гемолиза эритроцитов, уровнем церулоплазмينا (ЦП) в сыворотке крови и снижением уровня витаминов С и А и глутатион редуктазы [13]. При этом терапия карбамазепином приводит к увеличению уровня Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) и снижению содержания глутатиона в плазме крови [11]. При эпилепсии уровни СОД, глутатион редуктазы и каталазы также заметно изменяются [8,15]. Одним из механизмов эпилептических судорожных состояний является нарушение физиологического баланса между анти- и прооксидантными системами мозга [14] и крови [2], препараты же антиоксидантного действия  $\alpha$ -токоферол и Cu,Zn-СОД [3], а также оксакарбазепин [7] оказывают противозипилептическое регулирующее действие. Однако молекулярные механизмы непосредственного воздействия эпилептогена коразола на компоненты крови (металлопротеины) *in vitro* остаются невыявленными. Целью работы является определение воздействия токсических доз коразола на состояние анти- и прооксидантного действия металлопротеинов крови – регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК).

### Материал и методы

Металлопротеины (МП) антиоксидантного действия (МАД): Cu,Zn-СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов, ЦП и трансферрин (ТФ) – из сыворотки крови крыс, и металлопротеины прооксидантного действия (МПД): изоформы цитохрома (цит.) b558, в частности b558III эритроцитарных мембран (ЭМ), супероксид ( $O_2^-$ )-продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол получали в высокоочищенном состоянии биотехнологическим способом [4], без использования детергента при солиubilизации цит. b558 из ЭМ. При этом белковые фракции сыворотки растворимой части эритроцитов и ЭМ подверга-

ли ионообменной хроматографии на целлюлозах DE-52, KM-52 ("Whatman", Англия) и DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция) и гель-фильтрации – на сефадексах G-75 и G-100. Количество МАД и МПД определяли, рассчитывая характерную для данного белка плотность максимального оптического поглощения, что для цит. b558III имеется при 530 нм, супрола – 430 нм, ЦП – 610 нм и ТФ – 470 нм. Активность СОД,  $O_2^-$ -продуцирующая активность цит. b558III и супрола вычисляли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [1], определяя % ингибирования (для СОД) и прироста (для супрола и цит. b558III) образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности и  $O_2^-$ -продуцирующей активности принимали то количество белка, которое вызывает 50% ингибирование (для СОД) или 50% стимулирование (для супрола и цит. b558III) образования формазана. Активность каталазы определяли перманганатометрическим методом с учетом количества расщепленной за 1 мин (при 20°) перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) под воздействием определенного количества каталазы. За единицу каталазной активности принимали то количество белка, которое вызывает расщепление 0,1 М  $H_2O_2$  в приведенных условиях. Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит. b558III определяли оптическим спектральным методом, путем вычисления плотности максимального оптического поглощения феррогемоглобина (ферроHb) при 555 нм, под воздействием стехиометрического количества цит. b558 III ( $10^{-5}$  М) в аэробных условиях *in vitro* при 20° в течение 4–5ч [6].

Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см при 20°. Коразол получали из фирмы "Sigma" в кристаллическом виде. Коразол в дозе 50 мг вызывает 50% гибель крыс (ЛД - 50), а 70 мг – 100% (ЛД - 100) [3]. Исходя из этого был определен эффект приведенных токсических доз коразола (до 60 мг) на оптико-спектральные показатели и активность МАД и МПД. Коразол (10–60 мг/мл) инкубировали с определенным количеством МП (послед-

ние были растворены в 0,02 М калийфосфатном буфере (КФБ), рН 7,4 при 20° в течение 1 ч и 24 ч в аэробных условиях. В ходе получения и очистки МП были использованы центрифуги К-70 и К-24 (Германия), а также стеклянные колонки для ионообменной хроматографии (3x15, 2x20 см) и гель-фильтрации (2x90см). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия  $p$  ( $n=10$ ).

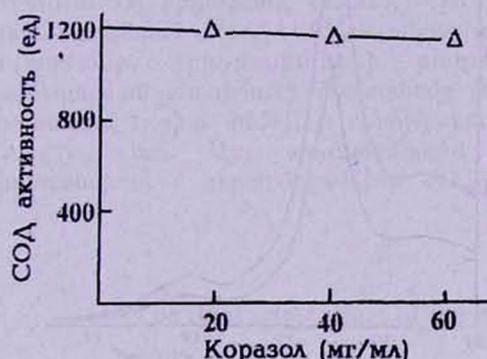


Рис. 1. Изменение активности Cu,Zn-COD под воздействием коразола в приведенных концентрациях после инкубирования фермента с коразолом в течение 1 ч при 20°

После 24 ч инкубирования коразола (60 мг/мл) с ЭМ (последние были смешаны с 0,04 М КФБ) не наблюдается изменения степени отщепления (рилизинга) изоформ цит. b558 ЭМ (при рН 7,4). Однако это вызывает резкое повышение степени агрегации изоформ цит. b558 (81,4±4,0%), как это показано на рис. 5а. При этом повышается величина оптического индекса ( $A_{412}/A_{530}$ ) цит. b558III от 8,7 до 9,1 и не-

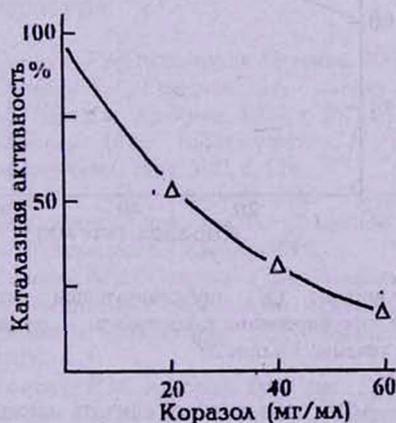


Рис. 3. Изменение активности каталазы после ее часового инкубирования с коразолом в приведенных количествах при 20°

## Результаты и обсуждение

В результате инкубирования коразол в приведенных условиях практически не влияет на активность СОД (рис. 1) и не изменяет форму и интенсивность (при 470 нм) ТФ (рис. 2). Однако коразол почти полностью (83,4±6,1 %) инактивирует каталазу (рис. 3), снижает  $O_2^-$ -продуцирующую активность (25,2±3,1 %) и метНб-восстанавливающую активность (18,7±1,9 %) цит. b558III (рис. 4).

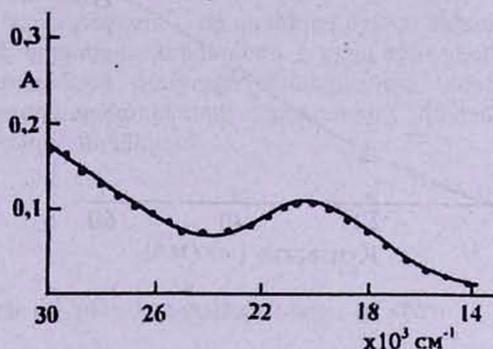


Рис. 2. Оптический спектр ТФ до (—) и после (....) инкубирования белка с 60 мг/мл коразолом в течение 24 ч при 20°

много снижается интенсивность поглощения (12,0±1,4 %) цит. b558III при 530 нм (рис.5б). Фактически коразол резко снижает растворимость изоформ цит. b558 ЭМ (они снова переходят в растворимую фазу при рН 9, с дальнейшим диализом против воды). Коразол несколько и необратимо снижает (до 12,2±1,1%) плотность поглощения ЦП (при 610 нм) (рис. 6). При этом ощутимо повышается  $O_2^-$ -продуцирующая активность

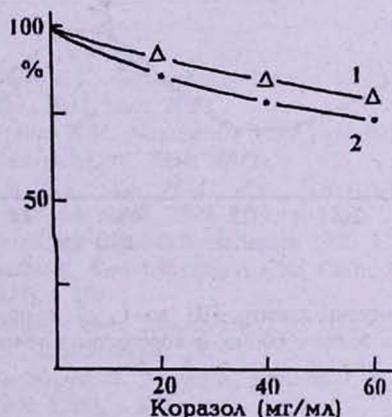


Рис. 4. Изменение метНб-восстанавливающей активности (1) и  $O_2^-$ -продуцирующей активности (2) цит. b558III ( $10^{-5}$ М) после его инкубирования с коразолом в приведенных количествах

супрола ( $49,1 \pm 3,7\%$ ) (рис. 7) с одновременным снижением стабильности (растворимости) этого липопротеина сыворотки высокой плотности. Повышение степени агрегации цит. b558 ЭМ и супрола под воздействием коразола может вызывать снижение текучести ЭМ и повышение вязкости сыворотки с нарушением

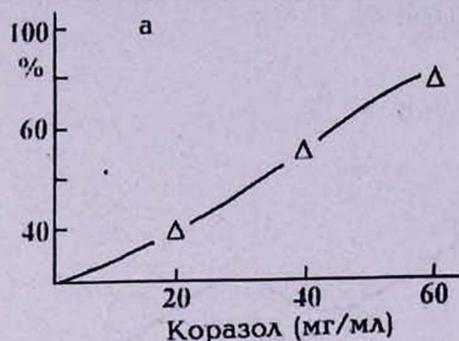


Рис. 5. а – изменение уровня агрегированного цит. b558III, полученного из ЭМ крыс после их инкубирования с 60 мг/мл коразолом в течение 24 ч при  $20^{\circ}$

Полученные результаты хорошо коррелируют литературные данные, связанные с увеличением уровня ЦП [13, 16] и каталазы [10, 12] под воздействием коразола (или другого эпилептогена пентилентетразола)

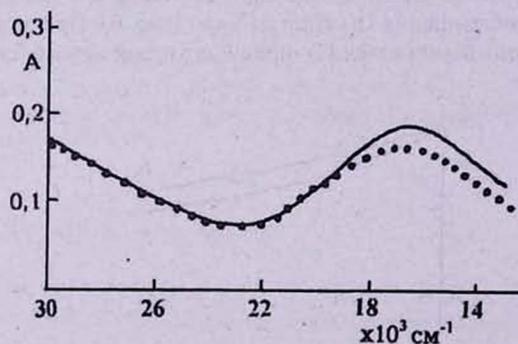
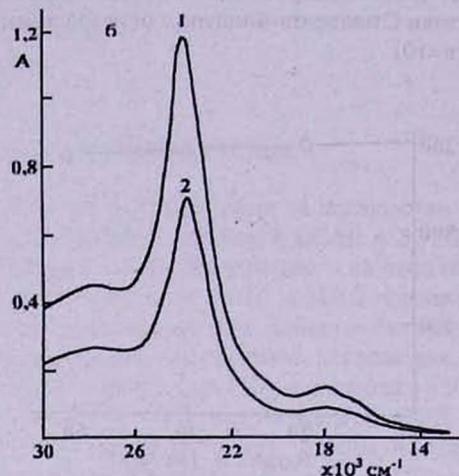


Рис. 6. Оптический спектр ЦП до (—) и после (.....) инкубирования белка с 60 мг/мл коразолом в течение 24 ч при  $20^{\circ}$

Можно заключить, что наряду с нейротоксическим действием [17] коразол оказывает определенное деградирующее действие на МАД и МПД, регуляторов

гемодинамики. С другой стороны, снижение метНб-восстанавливающей и  $\text{O}_2^-$ -продуцирующей активности цит. b558III может вызывать изменение гомеостаза кислорода (метНб не транспортирует  $\text{O}_2$  к клеткам) [13].



6 – оптический спектр поглощения нативного цит. b558III (1) и агрегированного цит. b558III (2)

*in vivo*. Это, видимо, является ответом адаптационных механизмов организма против снижения уровня ЦП и каталазы под воздействием коразола.

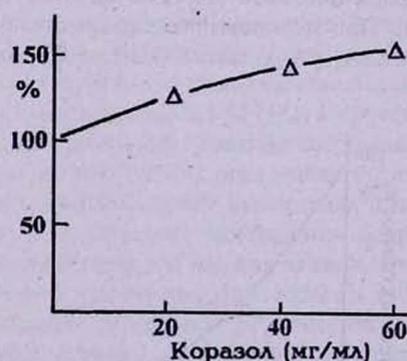


Рис. 7. Увеличение  $\text{O}_2^-$ -продуцирующей активности супрола после инкубирования с коразолом в приведенных количествах в течение 1 ч при  $20^{\circ}$

метаболизма АФК, что можно считать механизмом оксидативного повреждения крови под воздействием эпилептогена коразола.

Поступила 25.12.04

## Էպիլեպտոգեն կորազոլի վնասակար ազդեցությունը արյան մեդալոպրոթեինների վրա in vitro

Լ. Ա. Սիմոնյան, Գ. Մ. Սիմոնյան, Ա. Ա. Սիմոնյան, Մ. Ա. Սիմոնյան

Էպիլեպտոգեն կորազոլը (մինչև 60 մգ/մլ) 1-24 ժամ 20°-ում ինկուբացման հետևանքով ցուցաբերում է վնասակար ազդեցություն արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ազդեցության մետաղապրոթեինների վրա in vitro: Դա արտահայտվում է կատալազի ակտիվացումով (83,4±6,1%), ցիտոքրոմ (ցիտ.) b558III-ի O<sub>2</sub><sup>-</sup>-գոյացման (25,2±3,1 %) և մեթ.Քբ-վերականգնման (18,7±1,9%) ակտիվությունների նվազմամբ, էրիթրոցիտների թաղանթներում ազդեցման աստիճանի մեծացմամբ (81,4±4,0%): Նկատվում է ցիտ. b558III-ի օպտիկական ինդեքսի (A<sub>412</sub>/A<sub>530</sub>) աճ: Այդ պայմաններում կորազոլը գունաթափում է ցերուլոպլազմինը (12,2±1,1 %) և

բարձրացնում է սուպրոլի O<sub>2</sub>-գոյացող ակտիվությունը (49,1±3,7%), նվազեցնելով նրա կայունությունը (լուծելիությունը): Միաժամանակ կորազոլը գործնականորեն չի ակտիվացնում Cu,Zn-SOD-ը, չի վնասում տրանսֆերինին և չի փոփոխում էրիթրոցիտների թաղանթներից ցիտ. b558-ի իզոմերի արտազատման աստիճանը:

Եզրակացվում է, որ գործելով նշված մեխանիզմներով, կորազոլը հանգեցնում է թթվածնի ակտիվ միացությունների նյութափոխանակության կարգավորող մետաղապրոթեինների օքսիդատիվ վնասմանը in vitro պայմաններում:

### The damaging effect of the epileptogen corazole on blood metalloproteins in vitro

L.A. Simonyan, G.M. Simonyan, A.A. Simonyan, M.A. Simonyan

After the incubation of corazole (to 60 mg/ml) with blood metalloproteins in vitro, a damaging effect of these proteins is observed. This is expressed by inactivation of catalase (83,4±6,1%), decrease of O<sub>2</sub><sup>-</sup>-producing (25,2±3,1%) and met.Hb-reducing (18,7±1,9%) activities of cytochrome (cyt.) b558 III in erythrocyte membranes to 81,4±4,0%. Simultaneously an increase of the optical spectral index (A<sub>412</sub>/A<sub>530</sub>) of cyt. b558 III is observed. In these conditions corazole irreversibly bleaches ceru-

loplasmin (12,2±1,1 %), increases O<sub>2</sub><sup>-</sup>-producing activity of suprol (49,1±3,7%) and decreases its stability. Corazole does not practically inactivate Cu,Zn-SOD and does not damage transferrin, neither influences the releasing degree of isoforms of cyt. B558 from EM.

Thus, the toxic effect of corazole is expressed by oxidative damage of blood metalloproteins – regulators of metabolism of reactive oxygen species in vitro.

### Լիտերատուրա

1. Սիմոնյան Գ.Մ. *Мед. наука Армении*, 2002, 2, с.101.
2. Սիմոնյան Լ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ., Սիմոնյան Ա.Ա., Սիմոնյան Մ.Ա. *Биол. ж. Армении*, 2004, т. 56(1-2), с. 63.
3. Սիմոնյան Մ.Ա., Կոպչիկովա Ս.Ի., Գրոմով Լ.Ա. *Нейрохимия*, 1984, 3(2), с. 124.
4. Սիմոնյան Մ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ. *Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобретения N341 Армпатента, Ереван*, 1997.
5. Սիմոնյան Մ.Ա., Սիմոնյան Գ.Մ., Սիմոնյան Ք.Մ. *Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобретения N908 Армпатента, Ереван*, 2001.
6. Սիմոնյան Ք.Մ. *Автореф. канд. дис., Ереван*, 2004.
7. Bolayir E., Celik K., Tas A. et al. *Methods Find – Exp. Clin. Pharmacol.*, 2004, 26(5), p. 345.
8. Cengiz M., Yuksel A., Seven M. *Pharmacol. Res.*, 2000, 41(4), p. 423.
9. Della R.F., Granata A., Broccio M. et al. *Anticancer Res.*, 1995, 15, p. 2089.
10. Freitas R.M., Nascimento V.S., Vasconcelos S.M. et al. *Neurosci. Lett.*, 2004, 365(2), p. 102.
11. Liu C.S., Wu H.M., Kao S.H., Wei Y.H. *Clin. Neuropharmacol.*, 1998, 21(1), p. 62.
12. Singh R., Pathak D.N. *Epilepsia*, 1990, 31(1), p. 15.
13. Sudha K., Rao A.V., Rao A. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 303(1-2), p. 19.
14. Sutkovi D.A., Laponohov O.O., Huk A.P. et al. *Fiziol. Zh.*, 2002, 48(4), p. 53.
15. Turkdogan D., Toplan S., Karakos Y. *J. Child. Neurol.*, 2002, 17(9), p. 673.
16. Tutur – Crespo M. J., Hermida J., Tutor J. *C.Epilepsy Res.*, 2003, 56(2-3), p. 147.
17. Yegin A., Akbas S.H., Ozben T., Korgun K. *Acta Neurol. Scand.*, 2002, 106(5), p. 258.