

## Образование сывороточных цитохромов b558 в результате инкубирования крови *in vitro*

Г.М.Симонян, Р.М.Симонян, М.А.Симонян

Институт биохимии НАН РА

375014 Ереван, П.Севака, 5/1

**Ключевые слова:** кровь, сыворотка, цитохром b558, продуцирование

Цитохромы (цит) b558 различных типов являются участниками продуцирования супероксидных радикалов ( $O_2^-$ ) оксидоредуктазами [15, 19]. Эти гемопротеины локализованы в мембранах клеток плазмы (лейкоциты, лимфоциты и т.д.) [10, 14], эритроцитарных мембранах (ЭМ) и сыворотке крови млекопитающих [5] и рыб [4]. Однако в сыворотке венозной крови здорового человека цит b 558 не обнаружены, они присутствуют в сыворотке венозной крови человека при лимфобластических и миелобластических лейкозах [3] и в сыворотке плацентарной крови женщин [5]. Сывороточный цит b558II (особенно из сыворотки крови крыс) оказывает высокую толерантность к перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), более того, защищает Cu,Zn-СОД от повреждающих эффектов  $H_2O_2$  [8]. Присутствие изоформ цит b558 в сыворотке плацентарной крови и образование в сыворотке венозной крови человека при раке крови свидетельствует о важной роли этих гемопротеинов при повышении уровня активных форм кислорода (АФК) в сыворотке крови, в первую очередь  $H_2O_2$  как продукта ферментативного дисмутирования  $O_2^-$  ( $O_2^-$  и  $H_2O_2$  продуцируются НАДРН-зависимыми оксидоредуктазами, локализованными в клетках плазмы: ПМН лейкоциты, нейтрофилы, фагоцитирующие лейкоциты и т.д. [9, 11, 13, 16]. В сыворотке крови имеются в небольших количествах ферменты антиоксидантной активности, включая и каталазу [20]. Однако при патологических состояниях уровень этих антиоксидантов недостаточен для снижения повышенного уровня АФК, в частности  $H_2O_2$  [16]. Можно предположить, что адаптационные системы организма (крови) должны стимулировать образование других защитных систем – изоформ сывороточных цит b558. Для подтверждения объективности этого предположения необходимо создать условия для повышения уровня АФК, в частности  $H_2O_2$ , путем аэрации крови *in vitro* [16].

Цель работы состоит в определении уровня сывороточных цит b558, а также каталазы, церулоплазмينا, СОД и супрола в венозной крови человека, в крови крыс, а также в изолированной сыворотке, клетках плазмы, эритроцитах и гемоглобине после их инкуби-

рования в аэробных условиях *in vitro*.

### Материал и методы

Свежевытая венозная кровь здорового человека и кровь крыс (по 40 мл), а также сыворотка, клетки плазмы, эритроциты (по 20 мл), полученные из другой порции этой же крови человека и крыс, включая метгемоглобин (метHb), инкубировали в стеклянных открытых стаканах при  $4^\circ$  в течение 4 – 5 суток при ежедневном легком перемешивании проб в течение 2 мин. Цит b558I и цит b558II, а также другие металлопротеины крови (церулоплазмин-ЦП, Cu,Zn-СОД, каталаза и супероксидпродуцирующий липопротеин сыворотки – супрол) выделяли и очищали биотехнологическим способом [6] путем ионообменной хроматографии (на целлюлозах ДЕ-52, КМ-52 и сефадексе ДЕАЕ А-50) и гель-фильтрации соответствующих белковых фракций (на сефадексах G-75 и G-100). Суммарную фракцию цит b558 I и цит b558II из этих целлюлоз элюировали 0,04 М калий-фосфатным буфером (КФБ): супрол – 0,004 М, СОД и каталазу – 0,05 М и ЦП – 0,2 М КФБ. СОД-активность фракции определяли нитротетразолиевым синим методом, а каталазную активность – перманганатометрическим титрованием растворов  $H_2O_2$  в отсутствии и присутствии каталазы [2]. Электрофорез белков проводили по методу Маура и соавт [1] на 10% полиакриламидном геле. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия) с длиной оптического пути – 1 см при  $20^\circ$ . Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

### Результаты и обсуждение

После инкубирования венозной крови здорового человека и крови крыс в приведенных выше условиях из сывороток крови выделяли и очищали белки (ге-



мопротеины) слабокислого характера. Причем белки из сыворотки крови крыс очищали в электрофоретически гомогенном состоянии, а белки из сыворотки венозной крови человека содержали еще небольшие примеси (рис.1). Оптические спектры поглощения этих белков почти полностью совпадают со спектрами цит b558I и цит b558II из сыворотки крови крыс и из сыворотки плацентарной крови женщин без инкубирования крови (рис.2). Таким образом, эти белки являются сывороточными цит b558I и цит b558II. Однако выразительность альфа - поглощения (при 560 нм), особенно у цит b 558 I и цит b558II, полученных из сыворотки крови крыс после инкубирования в приведенных условиях, более ощутима, чем таковая у цит b558, полученного из сыворотки венозной крови человека. С другой стороны, у «инкубированных» цит b558I и цит b558II имеется максимальное оптическое поглощение при 470 нм, что не свойственно изоформам цит b558 эритроцитарных мембран (ЭМ) не только сильнокислого но и слабокислого характера (последний изоформ цит b558 элюируется из ДЕ-52 0,04 М КФБ). Оптический спектральный индекс ( $A_{412}/A_{530}$ ) для «инкубированного» цит b558I и цит b558II из сыворотки крови крыс составляет  $-12,4 \pm 3,1$  ( $P < 0,05$ ), из сыворотки венозной крови человека  $-8,8 \pm 0,3$  ( $P < 0,03$ ), из сыворотки крови крыс без инкубирования  $-11,0 \pm 2,3$  ( $P < 0,03$ ), для слабокислого характера цит b558 из ЭМ  $-9,5 \pm 1,1$  ( $P < 0,05$ ). Эти показатели свидетельствуют о том, что изоформы цит b558

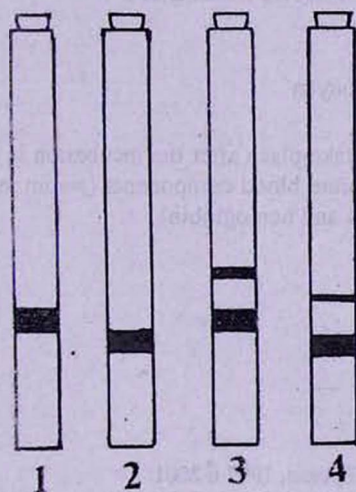


Рис.1. Электрофореграммы цит b558I и цит b558II из сыворотки крови крыс и из сыворотки венозной крови человека после инкубирования крови в аэробных условиях *in vitro* при 4° в течение 4 – 5 дней: для цит b558I из сыворотки крови крыс (1); из сыворотки венозной крови человека (2); для цит b558 II из сыворотки крови крыс (3); из сыворотки венозной крови человека (4). Белки растворены в 0,04 М КФБ

сыворотки венозной крови человека и сыворотки крови крыс несколько различаются. Возможно, это связано с сопутствующими примесями с цит b558 сыворотки венозной крови человека. При восстановлении этих цитохромов дитионитом натрия появляются характерные формы и максимум поглощения для цит b558 (альфа -полоса поглощения при 558 нм), как показано на рис.2.

Из надосадочных растворов (в 0,9% NaCl) изолированных эритроцитов, сывороток, клеток плазмы, а также из раствора метНб после инкубирования в приведенных условиях цит b558I и цит b558II не получают. Таким образом, образование сывороточных цит b558 происходит только при инкубировании цельной крови, а не ее отдельных компонентов. Вероятнее всего, в образовании сывороточных цит b558 участвуют клетки плазмы, которые содержат ядра, с соответствующей генетической системой, но не эритроциты, у которых при созревании ядра отсутствуют. Образование сывороточных цит b558 не связывается и с расщеплением метНб, отщеплением (рилизинг) цит b558 из эритроцитов (рилизинг цит b558 происходит только после инкубирования ЭМ [8]) или под воздействием протеаз, которые могли проникнуть в кровь с микроорганизмами. Скорее всего образование (возможно синтез) сывороточных цит b558 является совокупным действием цельной крови против  $H_2O_2$ , уровень которого повышается при аэрации крови [18].

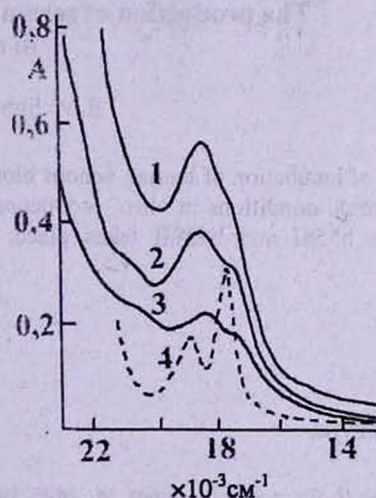


Рис.2. Оптические спектры поглощения цит b558I и цит b558II из сыворотки крови крыс и сыворотки венозной крови человека после их инкубирования в приведенных условиях: для цит b558I из сыворотки крови крыс(1); из сыворотки венозной крови человека (2); для цит b558II из сыворотки крови крыс (1); из сыворотки венозной крови человека (2) и для цит b558 слабокислого характера из ЭМ человека (3). Оптический спектр поглощения цит b558I или цит b558II из сыворотки венозной крови человека или сыворотки крови крыс после восстановления Fe+3 в гемовой группе этих гемопротеинов дитионитом натрия (4)



В пользу этого предположения свидетельствует и то обстоятельство, что образование сывороточных цит b558 и деградация супрола (65,3+/-8,1%,  $P<0,05$ ), каталазы (72,4+/- 7,3 %,  $P<0,03$ ), церулоплазмينا (86,4+/-5,5 %,  $P<0,05$ ) и Cu,Zn-СОД (41,0+/- 3,6 %,  $P<0,05$ ) происходит одновременно как результат воздействия  $H_2O_2$ . Действительно,  $H_2O_2$  вызывает деградирование приведенных металлопротеинов *in vitro* и *in vivo* [12, 17], а сывороточные цит b558 являются более толерантными агентами и защитными факторами биосистем плазмы к  $H_2O_2$ . Можно предположить, что образование сывороточных цит b558 является ответом адаптационных систем крови к  $H_2O_2$  *in vitro*. Не исключается,

что в этом процессе определенную роль играет также окислительное повреждение крови *in vitro*.

Хотя указанные механизмы образования сывороточных цит b558 после инкубирования крови в приведенных условиях пока окончательно не определены, однако продуцирование только сывороточных цит b558 является объективной реальностью. Будут ли происходить аналогичные явления при консервации и хранении крови или при введении в кровь  $H_2O_2$ , при гипероксии и каталазаемии *in vivo* и будет ли иметь положительный эффект экзогенно введенный цит b558 сыворотки, покажут дальнейшие исследования.

Поступила 28.02.05

### Շիճուկային b558 ցիտոքրոմների գոյացումը արյան ինկուբացման հետևանքով աերոբ պայմաններում *in vitro*

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

Մարդկային երակային արյան և առնետի արյան՝ աերոբ պայմաններում *in vitro* ինկուբացման հետևանքով տեղի է ունենում շիճուկային b558 ցիտոքրոմների գոյացում: Այս երևույթը բացակայում է արյան առան-

ձիմ բաղադրամասերի (շիճուկ, էրիթրոցիտներ, պլազմային բջիջներ և հեմոգլոբին) մասնատված պայմաններում ինկուբացումից հետո:

### The production of serum cytochromes b558 in result of blood incubation in aerobic conditions *in vitro*

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

In result of incubation of human venous blood and rats blood in aerobic conditions *in vitro*, production of serum cytochromes b558I and b558II takes place. This phe-

nomenon doesn't take place after the incubation in similar conditions of separate blood components (serum, erythrocytes, plasma cells and hemoglobin).

### Լիտերատուրա

1. Мауэр П. Диск-электрофорез. М., Мир, 1971.
2. Симонян Г.М. Автореф. канд. дис. «Окислительный стресс при злокачественных новообразованиях» Ереван, 2003.
3. Симонян Г.М. Мед.наука Армении, 2002, 2, 101.
4. Симонян Г.М., Серопян Н.А., Симонян М.А. и др. ДНАН РА, 2001, 101, 183.
5. Симонян М.А., Бабалян М.А., Симонян Г.М. Биохимия, 1995, 60, 1977.
6. Симонян М.А., Симонян Г.М. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобрет. Армпатента № 341 и 901, Ереван, 1997 и 2001.
7. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Ереван, 1999, с.48.
8. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А. Мед.наука Армении, 2003, 3, 13.
9. Badwey J.A., Karnevsky M.L. J.Biol.Chem., 1979, 254, p. 11530.
10. Condino-Neto A., Newburger P.E. Arch. Biochem. Biophys., 1998, 360, p. 158.



11. Dekaris I., Marotti T., Sprong R.C. et al. Immunopharmacol., Immunotoxicol., 1998, 20, p. 103.
12. Fridovich I. Ann. Rev. Biochem., 1995, 64, p. 97.
13. Fujiwara T., Kobajashi T., Takaya J. et al. Clin. Immunopathol., 1997, 85, p. 67.
14. Lee J.H., Park J.H. J. Protein Chem., 2000, 19, p. 643.
15. Quinn M.T., Parcos C.A., Jesaities A.J. Methods Enzymol., 1995, 255, p. 476.
16. Robinson J.A., Karnevsky M.L. Immunol. Ser., 1994, 60, p. 159.
17. Rohradanz E., Kahl R. Free Radic. Biol. Med., 1998, 24 (1), p. 27.
18. Sohdi A., Gupta P. Intern. J. Immunopharmacol., 1986, 8, p. 709.
19. Wallach T.M., Segal A.W. Biochem. J., 1996, 320, p. 133.
20. Yilemaz A., Adiguzel U., Tamer L. Clin. Exp. Ophthalmol., 2005, 33, p. 63.