

Антистрессорный эффект пролином богатого полипептида и соединения ВАС-167 при хронической интоксикации крыс ионами кадмия

М.С. Сиракян, А.А. Аветисян, А.А. Галоян, М.А. Симонян

Институт биохимии им.Г.Х.Бунятыана НАН РА, ЕГУ, химический факультет

375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1

Ключевые слова: хроническая интоксикация, ионы кадмия, пролином богатый полипептид, соединение ВАС-167, антистрессорный эффект

Уровень регуляторов аэробных метаболических процессов претерпевает характерное изменение при хронической интоксикации ионами кадмия (ХИИК) крыс путем подачи вместе с питьевой водой 5–50 мг/мл сульфата кадмия в течение 6–24 недель. Наблюдается снижение уровня цитохрома (цит) P450 и НАДРН-зависимой цит P450 редуктазы в клетках почечной ткани, а также микросомального цит b5, что вызывает снижение уровня детоксицирующих ксенобиотиков систем [21]. Кадмий вызывает оксидативное повреждение печени и других органов, клеток почек и увеличение уровня альфа-микроглобулина, N-ацетил-Д-глюкозаминазы с повышением уровня ионов кадмия в моче, снижением активности СОД и каталазы в эритроцитах [26] и почечной ткани [19]. ХИИК вызывает изменение редокс баланса перитонических макрофагов мышей, стимулирование продуцирования АФК, снижение уровня антиоксидантных защитных систем, повышение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), арахидоновой кислоты, простагландина E2 и циклооксигеназы с увеличением фона оксидативного стресса и воспалительных процессов [22]. В результате ХИИК существенно снижается активность АТФазы и СОД, церулоплазмينا (ЦП), уменьшается насыщенность трансферрина (ТФ), повышается уровень сульфогемоглобина и метгемоглобина (метНб) [16]. При подаче крысам диетического кадмия (5 мг/кг) в течение 7 недель происходит снижение уровня липопротеина сыворотки высокой плотности, ухудшение транспорта холестерина в крови, что вызывает сосудистое повреждение [20]. Ионы кадмия и других тяжелых металлов стимулируют продуцирование АФК различными системами, вызывают модифицирование ДНК и опухолеобразование, изменение гомеостаза кальция и сульфгидрила, повреждают глутатион и связываются с SH-группами белков, стимулируют

продуцирование перекиси водорода, которая превращается в гидроксильные радикалы по реакции Габера-Вейса [24], в результате взаимодействия с ионами переходных металлов. При ХИИК подавляется процесс стероидогенеза, а витамины антиоксидантной активности оказывают положительный эффект [18,23,25]. Молекулярно-биохимические механизмы оксидативного повреждения компонентов крови (сыворотка, эритроциты и эритроцитарные мембраны) при ХИИК еще полностью не определены, хотя уже в основном выявлены характерные сдвиги уровня и активности металлопротеинов анти- и прооксидантной активности при острой кадмиевой интоксикации крыс [14,15]. С другой стороны, по предварительным результатам, синтетический аналог пролином богатого полипептида (ПБП-1) из нейрогипофиза [4,17] оказывает антистрессорный эффект при интоксикации крыс ионами тяжелых металлов [6] и обладает НО-улавливающей активностью, а уровень этих высокоактивных интермедиатов аэробных метаболических процессов резко повышается при ХИИК. Как уже отмечалось, в результате ХИИК стимулируется продуцирование супероксидов. Это дает основание для применения различного характера экзогенных препаратов, обладающих супероксид-улавливающей активностью [5] для снижения повреждающих эффектов ХИИК. С этой точки зрения целесообразно было использование при ХИИК и соединения ВАС-167 [1], обладающего почти 3% СОД-миметической активностью [3].

Целью работы являлось определение количественных и качественных изменений металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО) и металлопротеинов прооксидантной активности (МПА) крови после 30-дневной ХИИК крыс в отсутствие и под влиянием ПБП-1 и соединения ВАС-167.

Материал и методы

Были использованы синтетический аналог препарата ПБП-1 (галармин) из нейрогипофиза быка [17] и соединение ВАС-167 [2]. ХИИК у белых крыс (190–220 г) вызывали подачей сульфата кадмия (5 мг/л) вместе с питьевой водой в течение месяца. Животные были разделены на 4 группы (по 10 крыс-самцов). В первую опытную группу (ОГ-1) вошли животные, подвергнутые ХИИК в течение месяца. В ОГ-2 вошли животные, которые подвергались ХИИК и получали внутрибрюшинно ПБП-1 (10 мкг/мл) через каждый третий день (всего 4 раза). В ОГ-3 вошли крысы, подвергнутые ХИИК и получившие аналогичным образом препарат ВАС-167 (10 мг/кг массы животного). Четвертую группу составили контрольные крысы. Кровь животных забирали после легкого эфирного наркоза и стабилизировали 0,2 % оксалатом натрия.

МАО (Cu,Zn-СОД, каталаза, полученные из растворимой фракции эритроцитов, ЦП и ТФ – из сыворотки крови) и МПА (изоформы цит b558 – цит b558I и цит b558II – из сыворотки крови, цит b558III, цит b'558III, цит b558IV, цит b'558IV и цит b558 нейтрального характера – из эритроцитарных мембран, а также супероксид-продуцирующий липопротеин сыворотки – супрол и цит b5 – из цитозоля эритроцитов) одновременно получали из крови крыс подопытных групп биотехнологическим способом, избегая использования детергента для солиubilизации белков из ЭМ [9].

При этом пробы очищенных ЭМ (по 10 мл, смешанные с 0,04 М калий фосфатным буфером, pH 7,4) отделяли для определения O_2^- -продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности цит b558III в гетерогенной фазе [12,13], а также для определения степени рилизинга (отщепления) цит b 558 из ЭМ путем инкубирования ЭМ в 0,04 М КФБ в аэробных условиях при 4° в течение 5 дней [13]. Количество полученных металлопротеинов (МП) определяли измерением плотности максимального оптического поглощения, характерного для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b558 сыворотки и ЭМ – 530, супрола – 430, ЦП – 610 и ТФ – 470 нм (голоформа).

Супероксиддисмутазную активность фермента и O_2^- -продуцирующую активность супрола и цит b558III [7] определяли нитротетразолиевым синим (НТС) путем вычисления процента подавления (в случае СОД) или стимулирования (в случае супрола и цит b558III) образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу активности СОД принимали то количество фермента, которое вызывает 50% ингибирование образования формазана. За единицу O_2^- -продуцирующей активности супрола или цит b558III принимали то количество белка, которое способно стимулировать образование формазана на 50%. Каталазную актив-

ность фракций из цитозоля эритроцитов определяли перманганатометрическим методом, рассчитав количество белка, расщепляющего 0,1М перекись водорода за 1 мин при 20°. МетHb-восстанавливающую активность цит b558III [12] определяли, используя свежеполученный метHb (ферриHb) крови крыс. При этом величина оптического поглощения альфа-полосы (при 565 нм) метHb составляла 0,9, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558III (при 530 нм) в реакционной смеси – 0,03. Непосредственно в кварцевых кюветах спектрофотометра к 3 мл раствора метHb добавляли 0,2 мл цит b558III или 0,2 мл ЭМ, смешанных с 0,04 М калий фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4. После быстрого перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в покое в аэробных условиях *in vitro* в течение 15–16 ч при 30°, затем быстро перемешав реакционную смесь определяли кинетику восстановления метHb до ферроHb путем измерения снижения интенсивности плотности альфа-поглощения метHb в течение 1,5–2 ч. Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм. Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности (P).

Результаты и обсуждение

Подобранная доза сульфата кадмия является более эффективной для месячной ХИИК. Об этом свидетельствует тот факт, что в ОГ-1 в конце указанного срока интоксикации наблюдалась гибель животных (32,5±3,1%), чего не произошло в ОГ-2 и ОГ-3. В течение ХИИК указанной протяженности наблюдаются неадекватные изменения уровня и активности МАО и МПА. В ОГ-1 происходит существенное увеличение уровня цит b5 (этот гемопротеин является переносчиком электрона для НАДН-метHb редуктазы в цитозоле эритроцитов [2]) для стимулирования процесса формирования оксигемоглобина в цитозоле эритроцитов в приведенных экстремальных условиях кадмиевой интоксикации. Подобное явление характерно для крыс при гипокинезии [2]. Действительно, подвижность животных в ОГ-1 намного снижена, чем у крыс контрольной группы. В ОГ-1 наблюдается и резкий рост уровня сывороточных цит b558, ответственных за обезвреживание перекиси водорода [8], уровень которой существенно повышается (об этом свидетельствует и резкое повышение активности каталазы в ОГ-1). В ОГ-1 заметно изменяются уровень и активность ключевого гемопротеина ЭМ – цит b558III, а также

уровень остальных изоформ цит b558 ЭМ. На фоне снижения эндогенного уровня цит b558III кислого характера и цит b'558 высококислого характера и небольшого повышения уровня цит b558IV и цит b'558IV основного характера, наблюдается резкое повышение уровня цит b558 нейтрального характера. Это свидетельствует о том, что при ХИИК гемопр-

теиновый состав ЭМ существенно изменяется, видимо происходит превращение одной формы цит b558 в другую, в ходе оксидативного повреждения ЭМ в ОГ-1. Это в свою очередь может нарушить микроструктуру ЭМ и снизить их стабильность. Эти изменения приводят к снижению НАДРН-зависимой супероксид-продуцирующей активности цит b558III в гетероген-

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня и активности МП крови после 30 - дневной ХИИК под влиянием ПБП-1 и соединения ВАС-167 по сравнению со 100% контрольными (интактными) показателями ($P < 0,05$, $n = 8$)

МП и активность	ОГ-1	ОГ-2	ОГ-3
Цит b5	+ 63,1±5,4	+ 48,3±3,7	+39,3±3,5
Сумма цит b558I и цит b558II	+ 284,6±37,9	+113,8±21,3	+167,3±45,7
Сумма изоформ цит b558 ЭМ до хроматографирования на целлюлозе КМ-52	-32,7±3,2	-14,3±2,4	-19,1 ± 3,8
Сумма изоформ цит b558 ЭМ после хроматографирования на целлюлозе КМ-52	-49,1±5,0	- 28,6±4,8	-12,3±1,4
Цит b558III	-28,7±3,8	-11,4±1,3	-16,3±4,0
Цит b558IV	+ 13,2 ±2,2	+ 18,9±1,7	+ 7,4±0,8
Цит b558 нейтрального характера	+ 207,6±39,7	+131,8±27,9	+124,4±41,7
Цит b' 558III	-95,2±7,3	- 84,6±7,7	-79,1±6,8
Цит b'558IV	+11,6±1,5	-10,5±1,2	+ 7,9±1,6
O ₂ ⁻ -продуцир. активность цит b558III в гомогенной фазе	+ 10,9±1,7	-7,5±1,3	- 19,4±3,0
O ₂ ⁻ -продуцир. активность цит b558III в гетерогенной фазе	-71,2±5,5	-44,6±4,1	-31,8±3,9
МетНб-восстанавл.активность цит b558III в гомогенной фазе	+75,3±8,0	+41,4±3,7	+ 30,1±4,0
МетНб-восстанавл. активность цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ)	-21,3±1,9	+ 10,1±1,1	+ 12,5±2,1
Комплексообразование Нб с цит b558 в ЭМ	+124,8 ±31,7	+74,9 ±8,2	+ 41,8 ±5,0
Степень рилизинга цит b558 из ЭМ	+27,9 ± 3,3	+ 6,4±0,9	+ 2,8±0,4
A ₄₁₂ /A ₅₃₀ для цит b558III	-16,1± 1,5	-6,9±0,2	-11,3±1,8
Супрол	-72,5± 5,1	-29,4±5,1	- 12,4±1,6
O ₂ ⁻ -продуцир.активность супрола	-42,1±15,6	-51,4±3,2	-67,3±9,7
Церулоплазмин	-65,4±8,2	-21,3±2,7	-24,2±1,9
Трансферрин	- 53,5±5,8	-48,9±4,5	-54,6±5,5
Cu, Zn-СОД	-61,8±5,5	+12,4±1,6	-4,4±0,2
Каталаза	+608,8±59,9	+201,9±35,8	+ 87,4±9,1

ной фазе (в ЭМ) и к небольшому ее увеличению в гомогенной фазе. При этом метНб-восстанавливающая активность цит b558III несколько повышается в гомогенной фазе и снижается в гетерогенной. Однако все эти изменения, включая и дестабилизацию ЭМ, вызывают проникновение Нб в ЭМ с образованием комплексного соединения Нб с цит b558III в этих мембранах (такое явление наблюдается при злокачественных новообразованиях [10,11]). Действительно ионы кадмия вызывают образование злокачественной опухоли в тканях крыс [27].

С другой стороны, в ОГ-1 из-за этих изменений ускоряется процесс самоотщепления (рилизинг) цит b558 из ЭМ при pH 7,4 (табл.1). Причем оптический спектральный индекс (A_{412}/A_{530}) для цит b558III снижается. Таким образом, наряду с количественными изменениями цит b558III претерпевает и качественные изменения в ОГ-1. Уровень другого МПА – супрола снижается в ОГ-1, скорее всего из-за усиления перекисного окисления фосфолипидных остатков этого липопротеина высокой плотности на фоне некоторого снижения ее супероксид-продуцирующей активности. Что касается МАА, можно заметить, что в ОГ-1 наблюдается существенное снижение их уровня в сыворотке крови и эритроцитах. Однако активность каталазы резко повышается. Этот факт свидетельствует о существенном повышении уровня перекиси водорода в крови и соответственном повышении уровня высо-

коактивных гидроксильных радикалов ($\text{HO}^\bullet$), которые являются деградирующими факторами для МАА и МПА. В ОГ-2 под влиянием, ПБП-1 при ХИИК происходят положительные сдвиги уровня этих МП (табл.1). Как мы уже отметили, ПБП-1 является скавенджером $\text{HO}^\bullet$ -радикалов, что предотвращает деградацию МАА и МПА в ОГ-2. При этом потребности увеличения активности каталазы организмом не наблюдается. В ОГ-3 положительный эффект оказывает и соединение ВАС-167, который имеет почти 3% СОД-миметическую активность [3]. Действительно, в результате ферментативного дисмутирования O_2^- образуется перекись водорода, которая продуцирует гидроксильные радикалы при восстановлении ионами переходных металлов. При ХИИК происходит и снижение уровня ТФ, который остается еще пониженным и в ОГ-2 и ОГ-3. Резкое снижение уровня каталазы в цитозоле эритроцитов в ОГ-3 может быть связано с небольшим деградирующим эффектом на каталазы соединения ВАС-167. Приведенные изменения вызывают дисбаланс между антиоксидантным статусом – АС (расчетный суммарный уровень МАА) и прооксидантным статусом – ПС (расчетный суммарный уровень МПА) сыворотки крови и эритроцитов (табл.2), создавая характерный фон оксидативного стресса крови при ХИИК. ПБП-1 и соединение ВАС-167 в большинстве случаев приближают уровни МП к норме, оказывая антистрессорный и регулирующий эффект

Таблица 2

Относительные изменения (%) АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов в опытных группах по сравнению со 100% контрольными показателями

Компоненты крови	ОГ-1		ОГ-2		ОГ-3	
	АС	ПС	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	-118,9	+212,1	-70,3	+84,4	-78,8	+154,9
Эритроциты	+568,4	+30,4	+215,0	+28,5	+111,9	+20,4

при ХИИК, однако в этом режиме они еще полностью не устраняют нарушения равновесия между анти- и прооксидантными статусами крови. Приведенные

изменения являются новыми молекулярно-биохимическими механизмами оксидативного повреждения крови при ХИИК.

Поступила 24.08.06

Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի եւ ՎԱՍ-167 միացության հակասթրեսային ազդեցությունը կադմիումի իոններով առնետների խրոնիկական թունավորման ժամանակ

Մ.Ս. Սիրականյան, Ա.Ա. Ավետիսյան, Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Ա. Սիմոնյան

Առնետների մոտ, խմելու ջրի հետ 5 մգ/լ CdSO_4 տալով՝ 30 օր տևողությամբ, առաջ է գալիս կադմիումային խրոնիկական թունավորում (ԿԶԹ), հարուցելով արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակալալակների և ակտիվությունների բնութագրական փոփոխություններ: Էապես աճում են շիճուկային ցիտոքլամ (ցիտ) b558-երի և էրիթրոցիտների թաղանթների (ԷԹ) չեզոք բնույթի ցիտ b558-ի էնդոգեն մակալալակները: Նկատվել է կոմպլեքսագոյացման երևույթ հեմոգլոբինի և ԷԹ ցիտ b558-ի միջև (սա բնորոշ է չարորակ նորագոյացություններին): Այսպիսով՝ ԿԶԹ ժամանակ առկա է չարորակ ուռուցքագոյացման գործընթաց՝ ուղեկցված ԷԹ

կայունության նվազմամբ: Անմախսադեպոնեն աճում է կատալազի ակտիվությունը (շուրջ 6 անգամ), շիճուկային ցիտ b558-երի մակալալակը, ինչը վկայում է ջրածնի պերօքսիդի քանակի կտրուկ աճի և դրա նյութափոխանակության վտանգավոր խախտման մասին ԿԶԹ ժամանակ: Այս փոփոխությունները հարուցում են արյան շիճուկի և էրիթրոցիտների հակա- և պրոօքսիդանտային կարգավիճակների շեղում՝ հիմք ստեղծելով արյան օքսիդատիվ վնասման համար: Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդը և ՎԱՍ-167 միացությունը ցուցաբերում են որոշակի հակասթրեսային կարգավորիչ ազդեցություն ԿԶԹ ժամանակ:

The antistressor effect of proline-rich polypeptide and compound BAS-167 at chronic intoxication of the rats by cadmium ions

M.S.Sirakanyan, A.A.Avetisyan, A.A.Galoyan, M.A.Simonyan

The chronic intoxication by cadmium ions (CICI) of the rats arises by supplying of the animals by the 5 mg/L CdSO_4 with drinking water during 30 days, which leads to the characteristic changes of the endogenous level and activity of blood anti- and prooxidative metalloproteins. The levels of the serum cytochrome (cyt) b558 and neutral cyt b558 from erythrocyte membranes (EM) are enhanced essentially. The formation of complex compound between hemoglobin and cyt b558 EM takes place (this effect is typical for malignant tumors). Thus, during CICI a malignant tumor is formed in the animals and a destability of

EM is observed. A drastic enhancement of the catalase activity (to 6 fold) and the level of serum cyt b558 at CICI is shown.

Thus, the level of hydrogen peroxide is extremally increased in the blood and dangerously changes its metabolism. These changes initiate the shifts of the anti- and prooxidative status of the serum and erythrocytes, causing blood oxidative damage. The proline-rich polypeptide and compound BAS-167 show definite antistressor and regulating effects at CICI.

Литература

1. Арутюнян В.С., Кочикян Т.В., Аветисян А.А., Кинзирский А.С. В кн: Актуальные проблемы эксперим. и клин. медицины, МЗ РА, 1998, с.409-411.
2. Акопян В.П., Симонян М.А., Манукян А.А., Симонян Р.М., Акопян А.А. Бюлл.эксперим.биол.мед., 2001, 11, с.527-529.
3. Варданян А.Р., Арутюнян В.С., Аветисян А.А., Симонян М.А. ДНАН РА. 2006, т.106, 2, с.177-181.
4. Галоян А.А., Априкян В.С., Маркосян К.А., Гурвич В.Я. Нейрохимия, 1998, т.15, 4, с. 361-372.
5. Мжельская Т.И. Бюлл.эксп.биол.мед., 2000, т.130, 8, с.124-133.
6. Оксюзян Г.Р., Симонян М.А., Галоян А.А. ДНАН РА. 2003, т.103, 2, с.160-165.
7. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Степанян И.Э., Карапетян А.В., Симонян М.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2003, т. XLIII, 1, с.30-34.
8. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. В кн.: Актуальные вопросы военной медицины, ЕрГМУ им.М.Герац, 1999, с.48-51.

9. Сиракян М.С., Симонян Г.М., Алексанян Серг.С., Симонян Р.М., Симонян М.А. Биол.ж.Армении, 2006, 1-2, с.61-67.
10. Симонян Г.М., Нерсисян А.К., Симонян Р.М., Симонян М.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 2005, т.22, 2, с.125-130.
11. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Нерсисян А.К., Симонян М.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2003, т.ХЛІІІ, 2, с.31-34.
12. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А. Мед.наука Армении НАН РА, 2004, т.ХЛІV, 1, с.43-46.
13. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян М.А., Галоян А.А. Мед.наука Армении, 2003, т.ХЛІІІ, 3, с.13-18.
14. Сиракян М.С., Симонян Г.М., Арутюнян А.А., Бабалян М.А., Симонян М.А. Вестник МАНЭБ, СПб., 2005, т.10, 12, с.286-292.
15. Сиракян М.С., Симонян Г.М., Бабалян М.А., Симонян Р.М., Симонян М.А. Вестник МАНЭБ СПб., 2005, т.10, 6, с. 187-191.
16. Asagba S.O., Obi F.O. Biometals, 2005, v.18, 2, p.121-132.
17. Galoyan A.A. Brain neurosecretory cytokines. Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Acad./Plenum Publishers, N.-Y., Boston, London, Moscow, 2004.
18. Iszard M.B., Liu J., Klaassen C.D. Toxicology, 1995, 104, 1-3, p.25-33.
19. Jurczuk M., Brzoska M.M., Moniuszko J.J. et al. Food Chem.Toxicol., 2004, 42, 3, p.429-438.
20. Hubs'ky Ju. J., Ersteniuk H.M. Ukr.Biochem. Zh., 2002, 74, 5, p.124-127.
21. Plewska A., Plewska D., Nowaczyk G. et al. Arch.Toxicol., 2004, v.78, 4, p.194-200.
22. Ramirez D.C., Gimenez M.S. Toxicol.Lett., 2003, 145, 2, p.121-132.
23. Sen Gupta R., Sen Gupta E., Dhakal B.K. et al. Mol.Cell., 2004, 17, 1, p.132-139.
24. Stoczynska A. Med. Pr., 2001, v.52, 5, p.355-359.
25. Suwalsky M., Villena F., Norris B. et al. J.Inorg.Biochem., 2004, 98, 6, p.1061-1066.
26. Uchida M., Teranishi H., Aoshima K. et al. Toxicol. Lett., 2004, 152, 3, p.451-457.
27. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Curr.Med.Chem., 2005, 12,10, p.1161-1208.