Биология

УДК 658.567:[577.1+616-097

С.В. ТКАЧЕВ, В.В. ШЕВЛЯКОВ, А.А. УШКОВ, Л.В. ПОЛОВИНКИН

ВЛИЯНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИЦИЙ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА*

In the present work is shown, appearance of oxidizing modification of proteins in blood serum of animals, which were subjected by subchronical influence of MMK, is accompanied by parallel changes of nonspecific humoral immunity. Probably, a main role, in realization of immunotoxigin effect of MMK, is playing of prooxidant's property of copper, which initiate of free radical reactions.

Механизмы, обусловленные иммунотоксическим действием тяжелых металлов, включают: депрессию функции β-лимфоцитов и продукции антител, приобретенные мутации генов иммунокомпетентных клеток, изменение молекулярной структуры мембранных рецепторов и антигенов, нарушение процессов межклеточного взаимодействия, активацию синтеза медиаторов воспаления и аллергии, нарушение процессов клеточной биоэнергетики, инактивацию белков системы комплемента [1–6]. Следует отметить, что ряд названных эффектов может быть вызван действием активных форм кислорода (АФК), выступающих в качестве агрессивных повреждающих агентов. Установлено, что гиперпродукция АФК приводит к повреждению внутриклеточных мембран, окислительной модификации белков, липидов и фрагментации ДНК [7–10]. На фоне окислительного стресса может развиваться вторичная иммунопатология, приводящая к появлению аутоантигенных детерминант и каскаду аутоиммунных реакций. В то же время в научной литературе содержится недостаточно сведений о роли перекисных процессов в иммуномодулирующем действии тяжелых металлов, в частности, отсутствует информация о роли перекисного окисления белков в реализации иммунотоксических эффектов медьсодержащих ксенобиотиков.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении процессов окислительной модификации белков и состояния системы гуморального неспецифического иммунитета в условиях интоксикации медьсодержащими ксенобиотиками, полученными в результате переработки промышленных металлсодержащих отходов и используемых в производстве медьсодержащих средств защиты растений, а также в качестве фунгицидов.

Материал и методика

Исследованы медьсодержащий раствор (МСР), представляющий собой водорастворимые аммиакатные комплексы меди, а также фунгициды на основе водной суспензии хлорокиси меди (ХОМ-I и ХОМ-II). Атомно-абсорб-

* Авторы статьи – сотрудники ГУ РНПЦГ.

This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.
To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm

ционным методом с применением спектрофотометра AAS Vario 6 («Analytik Jena AG», Германия) выявлены основные составные элементы МСР (г/л): медь – 105,4, цинк – 0,178, кадмий – 0,038; ХОМ-I: медь – 118,5, цинк – 0,094, кадмий – 0,011; ХОМ-II: медь – 83,2, цинк – 0,11, кадмий – 0,002.

Оценку влияния медьсодержащих ксенобиотиков на функциональное состояние иммунной системы и интенсивность процессов пероксидации белков проводили на беспородных белых крысах в условиях субхронического (30 и 60 сут) внутрижелудочного введения. Исследуемые препараты вводили в дозах 1/10 и 1/100 $ЛД_{50}$, что составило для ХОМ-I и МСР 710,0 и 71,0 мг/кг; 100,0 и 10,0 мг/кг соответственно. Для внутрижелудочного введения ХОМ-II использовали 1/10 максимальной дозы острого опыта – 1500 мг/кг веса животного. Контрольная группа животных в аналогичных условиях получала воду в эквивалентном объеме.

Функциональное состояние неспецифического гуморального иммунитета оценивали по содержанию циркулирующих иммунных комплексов [11] и активности лизоцима [12] в сыворотке крови, а также по интегральному показателю антимикробной резистентности – бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) [13]. Расчет БАСК и активности лизоцима производили путем вычисления разницы между оптической плотностью опытной и контрольной пробы, полученный результат выражали в процентах, за 100 % принимали оптическую плотность контрольной пробы. Иммунологические исследования проводили на многоканальном спектрофотометре «Multiskan EX» («Labsystems», Финляндия).

Степень пероксидации белков устанавливали по содержанию карбонильных производных аминокислотных остатков белков (КПА) в сыворотке крови [14], а также по накоплению битирозина и снижению флуоресценции триптофанилов белков. Флуоресценцию битирозина оценивали при $\lambda_{возб} – 325$ и $\lambda_{исп} = 416$ нм, флуоресценцию аминокислотных остатков триптофана – при $\lambda_{возб} = 297$ и $\lambda_{исп} = 336$ нм [15]; антиоксидантный потенциал сыворотки крови – по содержанию церулоплазмина [16]. Спектрофотометрические измерения выполнены на СФ-46. Флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре СФЛ1211А («Солар», Беларусь).

Статистическую обработку результатов проводили с применением параметрического *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В результате 30-суточного воздействия у животных выявлены значительные изменения в содержании продуктов окислительной модификации белков. Введение МСР и ХОМ-I в дозе 1/100 $ЛД_{50}$ приводит к достоверному по сравнению с контролем возрастанию количества КПА в сыворотке крови на 21 и 15 % соответственно. Увеличение дозы МСР и ХОМ-I до 1/10 $ЛД_{50}$ сопровождается статистически значимым накоплением битирозина на 48 и 18 % соответственно, КПА – 46 и 42 %. На фоне активации перекисных процессов, вызванных введением МСР и ХОМ-I в дозе 1/10 $ЛД_{50}$, наблюдается увеличение содержания в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов на 75 и 86 % и снижение БАСК на 10 и 13 % соответственно. В условиях интоксикации ХОМ-II значительные колебания показателей, характеризующих степень окислительных повреждений белков (снижение интенсивности флуоресценции остатков триптофана при росте уровня КПА и битирозина), протекают параллельно увеличению на 24 % количества циркулирующих иммунных комплексов. Содержание церулоплазмина возрастает в ответ на введение МСР и ХОМ-I в дозе 1/10 $ЛД_{50}$ на 19 и 21 % соответственно, тогда как использование ХОМ-II приводит к снижению количества этого антиоксиданта на 64 % (табл. 1).

К концу 60-суточного воздействия уровень свободнорадикальных процессов, а следовательно, и содержание продуктов пероксидации белков в организме экспериментальных животных остаются существенно выше конт-

This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.
To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm

рольных значений. При этом воздействие МСР и ХОМ-I в относительно низких дозах (1/100 $ЛД_{50}$) приводит к компенсаторному увеличению содержания церулоплазмина, а при увеличении дозы и срыве адаптационных возможностей его концентрация снижается. Параллельно отмечается повышенное содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови животных, получавших МСР и ХОМ-I в дозах по 1/10 $ЛД_{50}$, на 24 и 31 % соответственно, а также в группе животных, подвергшихся воздействию ХОМ-II, – на 27 %. При введении аналогичной дозы МСР было зафиксировано уменьшение бактерицидной активности сыворотки крови на 31 % (табл. 2).

Таблица 1

Показатели гуморального неспецифического иммунитета и маркеры окислительной модификации белков сыворотки крови на 30 сут внутрижелудочного введения медьсодержащих ксенобиотиков

Показатель	МСР		ХОМ-I		ХОМ-II
	1/100 $ЛД_{50}$	1/10 $ЛД_{50}$	1/100 $ЛД_{50}$	1/10 $ЛД_{50}$	
Лизоцим, %	66,5±0,83 68,2±1,43	70,4±0,39 68,2±1,43	65,7±0,79 68,2±1,43	67,6±2,42 68,2±1,43	71,2±1,62 73,7±1,02
БАСК, %	98,2±0,47 95,5±0,12	85,6±2,07 95,5±0,12	96,2±0,89 95,5±0,12	83,6±1,65 95,5±0,12	85,0±3,88 83,2±6,42
Циркулирующие иммунные комплексы, усл. ед.	53,2±6,07 53,7±4,63	94,0±5,44$^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$ 53,7±4,63	54,2±5,61 53,7±4,63	99,9±4,47$^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$ 53,7±4,63	66,8±3,57$^{\cdot}$ 54,0±4,55
КПА, ммоль/л	15,1+0,70 12,5±0,57	18,3±1,34 12,5±0,57	14,4±0,76 12,5±0,57	17,7±0,67 12,5±0,57	35,4±2,33 24,5±2,62
Битирозин, усл. ед.	0,51±0,017 0,56±0,033	0,83±0,061 0,56±0,033	0,52±0,029 0,56±0,033	0,66±0,027 0,56±0,033	0,86±0,057 0,55±0,053
Флуоресценция триптофана, усл. ед.	5,5±0,09 5,6±0,34	5,7±0,19 5,6±0,34	5,5±0,21 5,6±0,34	5,9±0,30 5,6±0,34	6,7±0,39$^{\cdot\cdot}$ 8,6±0,34
Церулоплазмин, мг/л	356,9±24,2 319,4±7,0	379,4 ± 17,6 319,4 ± 7,0	360,5±23,8 319,4±7,0	387,7±17,4 319,4±7,0	222,1±17,1 345,0±33,0

Примечание. Здесь и в табл. 2: в числителе отражены данные опыта, в знаменателе – контроля; $^{\cdot}$ – достоверные изменения по сравнению с контролем при P<0,05; $^{\cdot\cdot}$ – P<0,01, $^{\cdot\cdot\cdot}$ – P<0,001, $^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$ – P<0,0001.

Таблица 2

Показатели гуморального неспецифического иммунитета и маркеры окислительной модификации белков сыворотки крови на 60 сут внутрижелудочного введения медьсодержащих ксенобиотиков

Показатель	МСР		ХОМ-I		ХОМ-II
	1/100 $ЛД_{50}$	1/10 $ЛД_{50}$	1/100 $ЛД_{50}$	1/10 $ЛД_{50}$	
Лизоцим, %	82,3±0,83 82,0±0,83	83,4±0,67 82,0±0,83	71,6±1,06 73,2±1,54	72,1±0,79 73,2±1,54	73,9±3,09 73,7±1,02
БАСК, %	48,1±1,46 56,1±5,45	38,6±3,40 56,1±5,45	90,9±0,46 90,6±0,57	91,4±0,64 90,6±0,57	80,4±4,86 83,2±6,42
Циркулирующие иммунные комплексы, усл. ед.	61,8±2,12 61,0±3,49	75,5±3,89$^{\cdot}$ 61,0±3,49	57,0±4,49 59,8±6,71	78,3±4,10$^{\cdot}$ 59,8±6,71	68,8±3,70$^{\cdot}$ 54,0±4,55
КПА, ммоль/л	18,7±1,29 14,8±0,5	24,2±2,17 14,8±0,15	23,7±2,16 14,8±0,15	28,6±2,80 14,8±0,15	39,3±3,06 24,5±2,62
Битирозин, усл. ед.	0,75±0,039 0,62±0,011	0,73±0,032 0,62±0,011	0,62±0,013 0,62±0,011	0,74±0,037 0,62±0,011	0,76±0,060 0,55±0,053
Флуоресценция триптофана, усл. ед.	6,0±0,22 5,6±0,16	4,6±0,19$^{\cdot\cdot}$ 5,6±0,16	5,8±0,33 5,6±0,16	4,5±0,31$^{\cdot\cdot}$ 5,6±0,16	6,9±0,26$^{\cdot\cdot}$ 8,6±0,34
Церулоплазмин, мг/л	476,4±30,4 316,0±28,6	173,2±11,1 316,0±28,6	397,5±27,4 316,0±28,6	193,5±8,6 316,0±28,6	218,0±20,7 345,0±33,0

Таким образом, появление окислительно-модифицированных форм белков в сыворотке крови животных, подвергнутых субхроническому воздействию медьсодержащих ксенобиотиков, особенно в больших дозах, сопровождается параллельными изменениями неспецифического гуморального иммунитета, проявляющимися в снижении бактерицидной активности сыворотки крови и увеличении содержания циркулирующих иммунных комплексов. Обнаруженное снижение бактерицидной резистентности, возможно,

This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.
To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm

обусловлено свободнорадикальным повреждением таких формирующих ее факторов, как антитела, белки системы комплемента, β-лизин, и других менее идентифицированных компонентов. В свою очередь, формирование иммунного комплекса антиген – антитело является закономерным компонентом токсического процесса, сопровождающегося изменением аутоантигенной структуры белков тканей и направленного на нейтрализацию и элиминацию этих антигенов [17]. Важно подчеркнуть прослеживаемую в некоторых работах тесную связь между антиоксидантной системой и показателями иммунитета [18, 19]. Антиоксиданты ферментного и неферментного происхождения проявляют иммуномодулирующее действие, вероятно в основном опосредуемое мембраностабилизирующими эффектами на иммунокомпетентные клетки [20]. Обнаруженное в наших исследованиях снижение концентрации церулоплазмина предположительно вызвано его свободнорадикальным повреждением. Известно, что действие АФК на церулоплазмин приводит к увеличению его чувствительности к протеолизу, потере феррооксидазной [21] и, возможно, супероксиддисмутазной активности.

Учитывая высокое содержание меди в исследуемых композициях, логично предположить, что в осуществлении токсического эффекта ключевую роль играют ее прооксидантные свойства, реализуемые через реакции между Cu^+ и АФК (реакция Фентона и цикп Габера – Вейсса) и приводящие к генерации высокоактивного гидроксильного радикала [22]. Металлкатализируемое окисление белков представляет собой сайт-специфичный процесс, обусловленный взаимодействием АФК и иона меди на металлсвязывающей поверхности белка. Ион Cu^+ фиксируется на металлсвязывающем сайте белка, затем комплекс белок – Cu^+ реагирует с H_2O_2 и генерирует радикал $OH^{\cdot}$, который вызывает окислительную модификацию аминокислотного остатка. Для осуществления металлкатализируемого окисления необходимо присутствие доноров электронов (аскорбиновая кислота, НАДФН, НАДН), участвующих в восстановлении Cu^{2+} в Cu^+ и O_2 в H_2O_2 [23, 24].

Следовательно, в условиях интоксикации медьсодержащими ксенобиотиками окислительная модификация белков может выступать в качестве одной из причин формирования аутоантигенов и индукции аутоиммунного ответа. Последовательность событий при поступлении в организм промышленных ксенобиотиков, содержащих соединения меди или других переходных металлов, можно представить следующей схемой:

- индукция переходными металлами свободнорадикальных реакций, продукция АФК и их реакционных метаболитов, образование модифицированных форм белков и липидов, подавление активности антиоксидантной системы организма вследствие окислительной деградации ферментов антиоксидантов [9, 24, 25];
- формирование аутоантигенов и аутоиммунного процесса в результате активации иммунокомпетентных клеток, гиперпродуцирование ими медиаторов воспаления [26];
- образование иммунных комплексов, утилизация их тканевыми и циркулирующими макрофагами. Снижение активности иммунной системы вследствие развития окислительного стресса [2–6, 26].

Работа выполнена при поддержке ФФИ НАН Республики Беларусь (№ 151-Б03 от 14.04.03 г.).

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М., 1995.
2. Luster M., Don Germolec, Rosenthal G.J. // Ann. Allergy. 1990. Vol. 64. P. 427.
3. Luster M., Wurda D., Amentiul C. // Med. Clin. North. Amer. 1990. Vol. 74. P. 423.
4. Buchmuller-Rouller Y., Ransijn A., Mauel J. // Biochem. J. 1989. Vol. 260. P. 325.
5. Yang C.F., Shen H.M., Shen Y., Zhuang Z.X., Ong C.N. // Environ Health. Perspect. 1997. Vol. 105. P. 712.
6. McGabe V.J., Lawrence D. // J. Immunol. 1990. Vol. 145. P. 671.
7. Суслова Т.Б., Владимиров Ю.А. Биологические мембраны. М., 1973. С. 75.

This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.
To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm

8. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб., 1992. С. 148.
9. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1991. Т. 29.
10. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. // Успехи совр. биологии. 1993. Вып. 1. С. 71.
11. Шубик В.М., Кальницкий С.А., Сираздинов В.Г., Усольцев В.И. // Методические рекомендации по иммунологическому обследованию лиц, профессионально работающих с источниками ионизирующих излучений. Л., 1981. С. 16.
12. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Санникова А.А. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 4. С. 52.
13. Колориметрические методы исследования в иммунологии: Метод. рек. / Под ред. Л.П. Титова. М., 1992. С. 12.
14. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 41. № 1. С. 24.
15. Davies K.J. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. № 20. P. 9895.
16. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Мн., 1982. С. 368.
17. Касохов А.Б. // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 1999. № 5. С. 37.
18. Белохвостикова Т.С., Кирдей Л.Е., Гаврилова Е.Ю. и др. // Мед. иммунология. 2002. Т. 4. № 2. С. 228.
19. Дурманов К.Д. // Здравоохранение Казахстана. 1987. № 5. С. 39.
20. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам. М., 1988.
21. Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н. // Биохимия. 1988. Т. 53. Вып. 5. С. 816.
22. Gutterldge J., Wllklns S. // Blochemica et Biophysica Acta. 1983. Vol. 759. P. 38.
23. Stadtman E.R. // Free Radic Biol. Med. 1990. Vol. 9. P. 315.
24. Stadtman E.R., Oliver C.N. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 2005.
25. Schalch K. M. // Lipids. 1992. Vol. 27. P. 209.
26. Чиркин А.А. // Иммунопатология. 2000. № 1. С. 21.

Поступила в редакцию 16.02.2004.

Сергей Викторович Ткачев – научный сотрудник лаборатории общей токсикологии.
Виталий Васильевич Шевляков – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией гигиены труда в аллергоопасных производствах.
Александр Александрович Ушков – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей токсикологии.
Леонид Васильевич Половинкин – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией промышленной токсикологии.

УДК 576.851.49:663.1

Ю.В. СЕЛЕЗНЕВА, А.Н. ЕВТУШЕНКОВ, В.А. ПРОКУЛЕВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ БАКТЕРИЙ *PANTOEA AGGLOMERANS* С ИЗМЕНЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ КАРОТИНОИДНЫХ ПИГМЕНТОВ

We have used system of transposon mutagenesis. The mutants differing in their colour from the wild type strain were selected.
This procedure resulted in isolation of several classes of mutants – white, light yellow, pink and bright yellow. Strains with pink colouring supposedly have a defect in the lycopene cyclase gene and accumulate lycopene. Bright yellow strains have increased production of carotenoid pigments, which allows to use them for creation carotenoid overproducing strain.

Каротиноиды, принадлежащие к группе широко распространенных в природе жирорастворимых пигментов, получают с помощью химического синтеза и путем выделения из природных источников – растений и микроорганизмов [1]. Их цвет варьирует от светло-желтого до темно-красного. Каротиноиды применяют для косметических и фармацевтических целей, а также используют в пищевой промышленности и добавляют в корма для животных.

Бактерии *Pantoea agglomerans* являются природными продуцентами каротиноидов. Благодаря присутствию пигментов колонии этих микроорганизмов окрашены в желто-оранжевый цвет. Однако с точки зрения их промышленного использования исходный уровень продукции пигментов у штаммов дикого типа явно недостаточен.

This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.
To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm