СІМФЕРОПОЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. М.В.ФРУНЗЕ

ГОЛОВСЬКА ГАЛИНА ГРИГОРІВНА

УДК 577.112.842 - 57.081

СТРУКТУРНО- ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗМІН АЛЬБУМІНУ КРОВІ ПІД ДІЄЮ РІЗНИХ КСЕНОБІОТИКІВ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Сімферополь - 1997

Ав 39.110

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біохімії Кримського медичного інституту ім С.І.Георгієвського.

Науковий керівник - доктор біологічних наук,професор Толкачьова Неллі Василівна, Сімферопольський державний університет ім. М.В.Фрунзе,завідуюча кафедрою біохімії,

доктор біологічних наук,професор
Борисенко Світлана Миколаївна

ійні опоненти : доктор медичних наук,професор Ажицький Геннадій Юрійович, Кримский медичний інститут ім. С.І.Георгієвського,завідуючий кафедрою біоорганічної та біонеорганічної хімії,

кандидат біологічних наук Руднєва Ірина Іванівна,інститут біології південних морів НАН України,старший науковий співробітник

Провідна організація - Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Захист відбудеться "30" XII 1997р. о 14 год. на засіданні спеціалізованної вченої ради К 20.02.02 при Сімферопольському державному університеті ім. М.В.Фрунзе за адресою: 333036,м.Сімферополь, вул.Ялтинська,4.
З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Сімферопольського державного університету ім.М.В.Фрунзе.

Автореферат розісланий "____"_____1997р.

Вчений секретар
спеціалізованної вченої ради О.В.Янцев.

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00739234 (S)

Загальна характеристика дисертації

Актуальність теми. В останні роки широке розповсюдження набувають дослідження в галузі вивчення молекулярних пошкоджень альбуміну, обумовлених впливом різних ксенобіотиків та патологічними процесами (Троіцький, 1987; Селіванова, 1976; Борисенко,1990). Приєднання лігандів супроводжується гетерогенним конформаційним переходом молекули альбуміну, що призводить до появи модифікованих форм білка з різними фізико-хімічними властивостями,такими як електрофоретична рухливість,ізоелектричні точки, спектральні властивості,розчинність (Багдасар'ян,1976; Троіцький,1983; Ажицький,1984; Толкачьова,1991). Зроблене у 50-ті роки Г.В.Троіцьким припущення про постсинтетичні модифікації альбуміну знайшло потвердження в ряді робіт (Соркіна,1967; Косик,1972; та ін.). Одержано переконливі дані про існування модифікованої форми альбуміну, які свідчать про те, що причиною молекулярних пошкоджень за патологією є модифікація білка продуктами метаболізму (Борисенко,1987). Дослідження модифікованого альбуміну крові має першорядне значення з метою контролю течи захворювання та виявлення ступеня інтоксикації. Ще більше значення набула ця проблема у зв'язку з появою в літературі даних про активацію модифікованим білком стресових генів через систему убіквітіну,каталізуючого протеоліз цього білка (Varshavski, 1986; Степанов,1996). Крім того,відомо специфічне зв'язування пошкоджених форм білка з макрофагами (Anathan,Pizzo,1986). Незважаючи на певні успіхи, які досягнуті у вивченні структури і фізико - хімічних властивостей альбуміну в умовах патології, ще недостатньо розглянуті питання,пов'язані з появою модифікованого білка під різноманітною дією ксенобіотиків на організм в різні відрізки часу. Ця проблема набуває особливу актуальність останнім часом,коли навколишнє середовище зазнає інтенсивне забруднювання ксенобіотиками,а процес природної детоксикації грає роль у формуванні стійкості організму до хімічної дії.

Мета і завдання дослідження.

Метою цієї роботи було вивчення ступеня модифікації та функціональних характеристик альбуміну сироватки крові експериментальних тварин під дією на організм зварювального пилу і детергентів в різні відрізки часу. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Виявлення взаємозв'язку між вмістом модифікованих форм альбуміну та рівнем малонового діальдегіду (МДА) в сироватці крові під дією зварювального пилу різного складу на організм тварин.
2. Оцінка впливу елементного складу зварювального пилу на рівень модифікованих форм альбуміну в динаміці експерименту.
3. Вивчення ступеня модифікації альбуміну під впливом різних ксенобіотиків і виявлення можливості використання цього показника

для оцінки токсичності їх впливу на організм.

4. Визначення вмісту вуглеводних компонентів в альбуміні крові експериментальних тварин в залежності від ступеня модифікації альбуміну в різні відрізки часу.

5. Характеристика фізико - хімічних властивостей глікозильованих форм альбуміну сироватки крові.

Наукова новизна:

- вперше встановлено 2-х фазове зростання модифікованих форм альбуміну та рівня малонового діальдегіду в сироватці крові в динаміці експерименту під дією на організм тварин різних ксенобіотиків;

- вперше показано, що під дією зварювального пилу в ранні строки експерименту спостерігається збільшення кількості його складових елементів в сироватковому альбуміні, що супроводжується підвищенням рівня модифікованих форм;

- виявлено, що вміст модифікованої форми альбуміну є інформативним показником оцінки токсичності внаслідок дії на організм тварин різних детергентів і зварювального пилу;

- вперше дана характеристика фізико - хімічних властивостей глікозильованої форми альбуміну.

Практичне значення роботи.

Одержані результати про різний ступінь модифікації альбуміну в динаміці експерименту дозволяють рекомендувати показник вмісту модифікованих форм білка в якості критерію для оцінки ступеня токсичності організму тварин під дією різних ксенобіотиків. Встановлена залежність біологічної агресивності від твердих складових зварювальних аерозолей використовується при технології зварювальних матеріалів в інституті газозварювання ім. Е.О.Патона м.Києва. Дані про структурно - функціональні зміни альбуміну крові експериментальних тварин та фізико - хімічні властивості глікозильованих форм білка використовуються у лекційному матеріалі з загального курсу біохімії і спецкурсах : " Структурно - функціональні властивості білків", " Молекулярні механізми адаптаційних реакцій" на факультеті природознавчих наук державного університету і медичного інституту (Сімферополь).

Основні положення, що виносяться на захист:

- 2-х фазове зростання модифікованних форм альбуміну і рівня МДА під дією на організм тварин зварювального пилу і детергентів в динаміці експерименту є результатом впливу на білок ксенобіотиків в ранні строки та різних ендогенних низькомолекулярних сполук в пізні строки експерименту;

- структурна модифікація альбуміну крові в ранні строки експерименту корелює зі збільшенням кількості елементів в складі альбуміну під дією на організм тварин зварювального пилу;

- модифікація альбуміну в ранні строки експерименту супроводжується значним підвищенням вмісту вуглеводів в складі сиро-

ваткового альбуміну;

- глікозильовані форми альбуміну мають ряд відмін за фізико - хімічними властивостями порівняно з нативним білком.

Апробація роботи та упровадження. Дисертаційні матеріали було викладено та обговорено на 5-й Всесоюзній конференції з спектроскопії біополімерів (Харків, 1984), Всесоюзній конференції " Біохімія - медицині" (Ленінград, 1988), 5-й Всесоюзній конференції " Цитохром Р-450 та модифікація молекул" (Ялта , 1989), 5-му, 6-му,7-му Українських біохімічних з'їздах (Івано-Франківськ,1987; Київ,1992,1997), науково-практичних конференціях з зварювальних матеріалів (Київ,1992,1994), на засіданнях Кримського відділення Українського біохімічного товариства та наукових конференціях кафедри біохімії Кримського медичного інституту (Сімферополь).

Декларація особистого внеску дисертанта в розробку наукових результатів досліджень. Представлені в роботі наукові матеріали і фактичні дані є самостійним внеском автора в розроблену проблему. Постановка експерименту, лабораторні дослідження та обробка результатів проведені автором особисто.

Публікації. Основні результати досліджень опубліковані в 9-ти друкованих роботах.

Об'єм та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 105 сторінках друкарського тексту та складається з вступу, 6-ти глав, висновків, списку основної літератури, що містить 156 посилань на роботи вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота проілюстрована 17 рисунками, та 13 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження була сироватка крові та препаративно виділений альбумін експериментальних тварин під дією детергентів і зварювального пилу різного складу (усього 500 тварин). Крім того,для уточнення характеру структурних змін альбуміну крові викликали кардіопатологію (30 тварин). В якості контролю досліджували сироватку крові і альбумін здорових тварин (120 щурів та 20 кролів). Вплив різних детергентів вивчали на щурах-самцях лінії Вістар масою 200-250 г (в кількості 100 тварин). Кожній тварині уводили внутрішньочеревинно 1/3 літальної дози детергенту із розрахунку 4 г/кг ваги. Для оцінки дії зварювального пилу було досліджено 400 самців-щурів, яким відповідно прийнятому стандарту (Кустов, 1972) уводили суспензію зварювального пилу у фізіологічному розчині в кількості 50 мг в трахею під наркозом 2-х кратно через добу.

Експериментальну кардіопатологію викликали у 2-х групах тварин (по 15 кролів, вагою 2,5-3,0 кг). Одній групі тварин для розвитку адреналінової кардіоміопатії уводили внутрішньовенно 0,1 % розчин адреналіну гідрохлоріда, із розрахунку 0,2 мг/кг ваги.

Другій групі для появи коронарогенного некрозу м'язів серця оперативно перев'язували ліву венечну артерію. Діагноз підтверджен гістологічними дослідженнями, які проводились на кафедрі гістології Кримського медичного інституту. Оцінку фізико-хімічних властивостей глікозильованого альбуміну проводили з використанням сироватки крові практично здорових людей (20 чоловік). Кров брали на станції переливання крові м.Сімферополя.

В роботі використовано методи аналітичного та препаративного гель-електрофорезу (Davis, 1964; Гордєєв, 1970; Ажицький, Багдасарьян, 1975), імунохімічного аналізу (Ouchterlony, 1957; Грабар, 1963), методи кількісного визначення білка, ліпідів (Кочетов, 1980; Покровський, 1969), продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) (Asakawa, 1980), методи визначення вуглеводів (Готтшалк, 1969; Keyser, 1964; Луцик, 1987), модифікованих форм альбуміну (Троіцький, 1986), ізоелектричних спектрів (Троіцький, Ажицький,1984), молекулярної маси (Lambin, 1978), методи спектрального аналізу: температурно-пертубаційно-дефіренціальна спектрофотометрія (ТПДС) (Демченко, 1981), дисперсія оптичного обертання (ДОВ) (Троіцький, 1965).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення ступеня модифікації альбуміну під дією різних ксенобіотиків в динаміці експерименту

Нашим завданням було виявити модифікацію білка внаслідок впливу різних ксенобіотиків в різні відрізки часу. На підставі одержаних даних по вивченню ступеня структурних змін альбуміну під дією детергентів (ДТ) та зварювального пилу (ЗП) на організм тварин в динаміці експерименту встановлено 2-х стадійне зростання модифікованих форм цього білка. Так, під дією ДТ процес модифікації альбуміну проходить в перші години та доби експерименту. Найбільше зростання рівня модифікованого альбуміну ($A_м$) відмічається після уведення ДТ-1, в склад якого входить бутанол та сечовина, що є факторами денатурації білка (рис.1).

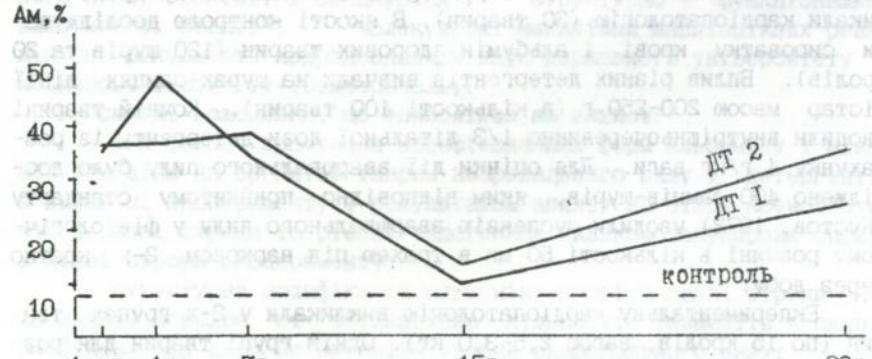


Рис. 1. Вплив детергентів на вміст модифікованого альбуміну в динаміці експерименту.

Взаємодія детергентів відбувається в регіонах, які специфічно зв'язують жирні кислоти що призводить до конформаційних змін альбуміну, котрі обумовлюють появу інших неспецифічних місць, здатних зв'язувати ДТ (Заречна, 1981; Луйк, 1984).

У більш пізні строки (30 діб) спостерігається повторне збільшення вмісту модифікованого альбуміну. Можливо, що в певні строки і в залежності від рівня дії ксенобіотиків системи кон'югації не справляються з ліквідацією метаболітів, внаслідок чого відбувається їх накопичення і створюються умови для розвитку інтоксикації. Проведені гістологічні дослідження підтвердили наявність патологічного процесу під дією ДТ у пізні строки впливу. Поряд з дією детергентів вивчено вплив на організм тварин зварювального пилу, що має велике практичне значення в сучасних умовах забруднення навколишнього середовища. ЗП - агломерати, які формуються при конденсації високотемпературного пару. Частинки зварювального пилу мають розміри від декілька сотих до декілька десятих часток мкм. Окремі частинки є неоднорідні і складаються з ядра та оболонки. Склад ядра визначається, головним чином, сполуками Fe_3O_4, $MnFe_2O_4$, а в склад оболонки входять силікати, карбонати, фториди K^+, Na^+, Ca^{2+} (Войткевич, 1987). Основою дії пилу є перехід його частинок в рідинне тканинне середовище (Войткевич, 1985) внаслідок розчинення та подальшого зв'язування компонентів зварювального пилу з альбуміном. З усіх вивчених варіантів зварювального пилу (усього 19) в таблиці 1 наведені ЗП, котрі характеризуються найбільш значними структурними змінами альбуміну в динаміці експерименту.

Таблиця 1

Вміст модифікованого альбуміну в сироватці крові тварин після уведення ЗП в динаміці експерименту (M±m)

ЗП	Модифікований альбумін,%				
	Строки дослідження				
	1 доба	7 діб	15 діб	1 місяць	4 місяця
2	5,2±0,7	4,3±0,8	5,0±0,5	13,8±1,8*	7,1±1,0*
3	6,8±1,2*	4,8±0,9	5,6±2,0	15,8±2,4*	4,1±1,3
6	5,0±0,5	8,0±2,2*	5,2±1,5	4,0±1,0	5,1±0.7
12	4,0±1,2	24,9±1,1*	8,1±0,5	13,0±2,1*	9,6±1,1*
32	5,0±0,3	6,0±0,3*	4,9±0,6	5,0±0,3	4,8±1,3
Контроль	4,1±0,3	4,5±0,6	4,5±0,7	4,2±0,3	4,1±0,8

Примітка: * - вірогідність відмін порівняно з показниками контролю

Як показали отримані нами результати, вплив відзначених ксенобіотиків є значно меншим порівняно з дією детергентів, які

призводять до модифікації білка вже в перші години експерименту.

З даних таблиці випливає що вірогідне збільшення рівня модифікованих форм альбуміну спостерігається в 1-шу добу експерименту після дії ЗП 3, на 7 добу - ЗП 6, 12, 32, з найбільш значними кількісними змінами білка (24,9 %) після уведення ЗП 12. Під тривалою дією зварювального пилу (1-4 місяця) може спостерігатися як первинне (ЗП 2), так і вторинне підвищення концентрації модифікованих форм альбуміну (більш ніж в 3 рази) порівняно з контрольними даними, як у випадку впливу ЗП 3, 12.

При використанні полум'яно-фотометричного і атомно-адсорбційного методів (інститут ім. Є.О. Патона, м. Київ) нами проведено визначення вмісту деяких елементів, таких як, Mn^{2+}, Na^{+}, Ca^{2+}, K^{+} і Fe^{3+} в складі альбуміну під дією ЗП 12, 32. Як випливає з даних таблиці 2 в ранні строки експерименту рівень елементів в альбуміні тварин був вище порівняно з контрольними величинами. Винятком був вміст Ca^{2+} під дією ЗП 12. Фазовий склад ЗП 32, який забезпечує більшу розчинність пилу порівняно з ЗП 12, обумовлює більш значну кількість таких елементів як Ca^{2+}, Na^{+}, Fe^{3+} в складі альбуміну в ранні строки експерименту.

Таблиця 2

Вміст елементів в альбуміні після дії ЗП

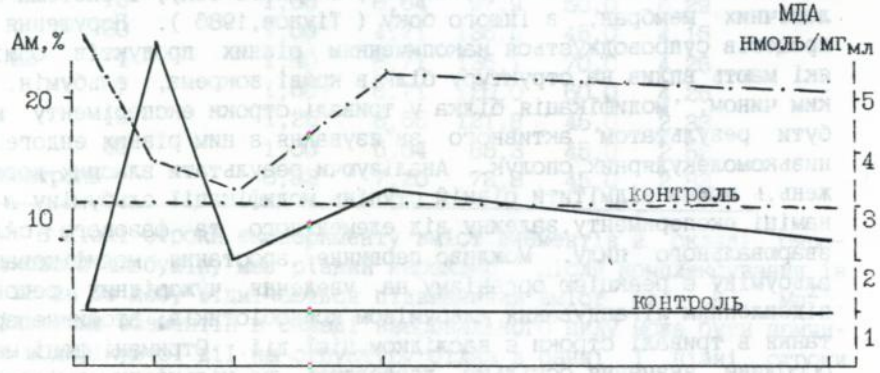
ЗП	Строк, дослідження, доби	Вміст елементів, мкг/мл				
		Mn^{2+}	Ca^{2+}	Na^{+}	Fe^{3+}	K^{+}
12	1	1,00	5,65	121,8	50,0	3,67
	7	1,25	6,48	117,2	50,0	4,70
	15	1,00	6,64	97,9	50,0	6,29
	30	1,00	4,71	136,5	45,0	4,15
32	1	1,00	8,71	136,1	70,0	4,26
	7	1,00	8.71	120,0	60,0	4,26
	15	1,25	5,65	121,8	45,0	2,33
	30	1,00	6,64	85,3	45,0	2,52
Контроль		0,83	7,20	78,8	45,0	2,83

В пізні строки експерименту вміст елементів в складі сироваткового альбуміну має різний характер. Після комплексування із ЗП 12 на 30 добу відмічається підвищений вміст Na^{+}, K^{+}, Mn^{2+}. Збільшення елементів в складі зварювального пилу може бути причиною модифікуючої дії на структуру білка в ранні і пізні строки експерименту. Звертає до себе увагу ЗП 32, під дією якого в пізні строки спостерігалося підвищення вмісту елементів Na^{+}, Mn^{2+} в альбуміні, в той час як рівень модифікованих форм цього білка не змінювався, що є підтвердженням іншого характеру модифікації білка. Для доказу впливу зварювального пилу на структуру альбуміну

проводили in vitro визначення параметрів дисперсії оптичного обертання (ДОО) при зв'язуванні ЗП з білком. Використовували ЗП 12, 32, які згідно попереднім даним, отриманих в дослідах in vivo " див.табл.1", мали різний характер дії на сироватковий альбумін в динаміці есперименту. Так, під впливом ЗП 12 відбувалося значне вірогідне зростання вмісту Ам в ранні і пізні строки, а під дією ЗП 32 структурні зміни відбувалися на 7 добу. На підставі данних, отриманних спектрополяриметричним методом,визначено,що під дією ЗП 12 відбуваються структурні зміни білка, які супроводжуються зниженням констант $-B_o$ до 265 порівняно з контрольними величинами ($-B_o$ =295), в той час як під дією ЗП 32 параметри ДОО білка змінювалися менш виражено ($-B_o$ = 275). Одержані нами результати свідчать про те,що в ранні строки експерименту під дією складових компонентів ЗП на організм тварин можлива конформаційна перебудова альбуміну, яка супроводжується появою модифікованих форм білка.

За даними літератури іони металів здатні зв'язуватися з білками в різних ділянках з різними функціональними групами ($-NH_2$,-OH, -COOH) за допомогою координаційних, іонних, електростатичних та ковалентних зв'язків (Левіна,1972 ; Соркіна,1990). Приєднання надлишкової кількості лігандів призводить до появи можливості конформаційної перебудови білка, що обумовлює формування вторинно зв'язуючих ділянок (Луйк,1984). Причиною підвищення концентрації Ам за тривалою дією ЗП (1 - 4 місяця), можливо, є недостатня розчинність ЗП в біологічних системах, що може обумовлювати тривале надходження у кровопотік надлишкових концентрацій хімічних елементів, які входять в склад пилу. До пошкоджуючих агентів найбільш схильні в живій клітині 2 системи: генетичний апарат системи біосинтезу, з одного боку, і системи біологічних мембран, з іншого боку (Тіунов,1986). Порушення цих процесів супроводжується накопиченням різних продуктів обміну, які мають вплив на структуру білків крові,зокрема, альбумін. Таким чином, модифікація білка у тривалі строки експеріменту може бути результатом активного зв'язування з ним різних ендогенних низькомолекулярних сполук. Аналізуючи результати власних досліджень, можна відмітити різній ступінь модифікації альбуміну в динаміці експерименту,залежну від елементного та фазового складу зварювального пилу. Можливо,первинне зростання модифікованого альбуміну є реакцією організму на уведення чужорідних речовин, підсиленням лігандування альбуміном ксенобіотиків; вторинне зростання в тривалі строки є наслідком цієї дії. Отримані дані мають особливе значення,оскільки дозволяють за кількісним вмістом Ам зробити оцінку токсичності зварювального пилу та розмістити в ряд вивчаємі ЗП за ступенем спаду агресивності згідно їх впливу на організм у тривалі строки. Експериментальні дані обгрунтовані математично за допомогою рівняння зв'язку, одержаного методом багатомірного регресіонного аналізу (Войткевич,1990).

Для оцінки пошкоджуючої дії ЗП на організм нами було вивчено вміст ТБК- активних продуктів в плазмі крові експериментальних тварин. Встановлено, що в динаміці експерименту спостерігається значна інтенсифікація процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), яка має 2-х стадійних характер (рис.2.). На початкових етапах експерименту (1 - 7 діб) при найбільшої активності розчинення ЗП в біологічних середовищах значна активація реакцій ПОЛ (в 2 рази) може бути проявом дії елементів Mn^{2+} та Fe^{3+}, які входять в склад зварювального пилу і, як відомо, є прооксидантами (Владіміров,1987, Chevion,1990), рівень яких в складі альбуміну крові у відповідні строки був вірогідно вище порівняно з контрольною групою тварин. Зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 15 добу під дією ЗП,можливо,є доказом активації системи антиоксидантного захисту (Гелескул,1991) та більш інтенсивного включення ендогенних перекисних продуктів в хімічні реакції,що каталізуються циклооксигеназами з утворенням біологічно активних ейкозаноїдів,важливих біорегуляторів клітинного метаболізму (Cappin,1987). Повторне підвищення рівня ТБК-активних продуктів (в 2 рази) в більш пізні строки експерименту (1 - 4 місяця),що вказує на підсилення процесів ПОЛ, відображає прояв значних порушень метаболічних процесів в організмі тварин. Встановлений нами взаємозв'язок структурних змін альбуміну та процесів ПОЛ в різні відрізки часу експерименту,як показано на рис.2, свідчить про 2-х фазовий вплив ЗП на організм тварин. Визначення показників вмісту модифікованого альбуміну та продуктів ПОЛ в плазмі крові експериментальних тварин застосовано в інституті газозварювання ім.Е.О.Патона м.Києва в якості інформативного тесту при створенні екологічно чистих зварювальних матеріалів з метою попередження токсичного впливу складових компонентів ЗП на організм осіб, які працюють в умовах газозварювання.



Рiс.2. Вміст МДА та Ам в сироватці крові після уведення ЗП 12

_____ Ам _.-.-.-_ МДА

Визначення вуглеводних компонентів, що зв'язуються з альбуміном в експериментальних умовах

За даними літератури (Борисенко,1990) відомо, що при деяких патологічних станах модифікація білків обумовлена збільшенням кількості вуглеводів. Проте до теперішнього часу не вивчено питання про вплив ксенобіотиків на процеси неферментативного глікозилювання альбуміну в експериментальних умовах,що й було підставою для аналізу вмісту вуглеводів в складі білка під впливом детергентів в динаміці експерименту. Для вивчення наявності вуглеводів в білку використовували детергенти різного хімічного складу,що містять 20% та 45% активної речовини.

Як показали проведені дослідження (табл.3),значне підвищення вуглеводів відбувається в перші години експерименту (12,1%). Особливо значні зміни відмічаються на 7 добу (16,4%) порівняно з контрольною групою (0,9%). Можливо,причиною високого рівня вуглеводів в перші доби є реакція на стрес, яка викликає підвищення секреції катехоламінів,здатних індуцирувати процес розщеплення глікогену внаслідок підвищення активності гормон чутливої фосфорилази.

Таблиця 3

Вміст вуглеводів в альбуміні сироватки крові та його модифікованної форми в динаміці експерименту під дією детергентів

Строки дослідження	Вуглеводи,%	Ам,%
1 доба	12,1 ± 0,8	36,3 ± 2,1
7 діб	16,4 ± 0,8	38,3 ± 1,0
15 діб	4,0 ± 1,0	13,3 ± 1,3
1 місяць	3,0 ± 0,2	35,0 ± 1,7
4 місяця	2,4 ± 0,3	16,3 ± 2,4
Контроль	0,9 ± 0,2	8,0 ± 0,8

Проте,може бути підвищення активності ферментів, які каталізують реакції глюконеогенезу. Подальше підвищення вмісту вуглеводів в складі альбуміну може бути обумовлено необхідністю їх активного використання в різних реакціях. Вірогідне зниження рівня вуглеводів в альбуміні на 15 добу свідчить про включення компенсаторних систем організму на уведення детергентів. В наступні строки (1 - 4 місяця) відбувається подальше зменшення вмісту вуглеводів, який не досягає рівня контрольної групи тварин, що може бути результатом " старіння білка" та утворення продуктів глибокого глікозилювання (Серамі,1987 ; Harding Yohn, 1989).

Зіставлення кількості вуглеводів з рівнем Ам дає можливість спостерігати кореляційну залежність у відрізку часу від 1 до 15 діб. Значне збільшення рівня вуглеводів в білку та його модифі-

кованої форми спостерігається на 7 добу експерименту з наступним різким зниженням їх кількості на 15 добу. Через 1 місяць після уведення ДТ спостерігається повторий значний зріст рівня Ам (в 2,5 рази) при значному зниженні кількості вуглеводів в складі альбуміну порівняно з результатами попередніх дослідників. Встановлена кореляційна залежність вмісту вуглеводів, що зв'язуються з альбуміном, та рівня Ам в ранні строки узгоджуються з даними літератури відносно модифікуючої дії вуглеводів на білок (Багдасар'ян, 1978; Толкачьова, 1991). Разом з тим, порушення цієї залежності в пізні строки експерименту дає підставу уважати, що модифікація альбуміну може бути обумовлена не тільки дією вуглеводів, але й є результатом метаболічних порушень, які відбуваються в організмі під дією ДТ.

Аналогічний характер змін у вмісті вуглеводів, що зв'язуються з альбуміном, виявлено в умовах розвитку патологічного процесу у тварин з експериментально викликаною кардіоміопатією. Високий рівень вуглеводів в альбуміні відмічається в ранні строки експерименту порівняно з контрольною групою тварин (30,0 М/М; 20,0 М/М білка ,відповідно) при значному збільшенні кількості його модифікованих форм (25,4% ; 3,0%, відповідно), що, як відзначалося раніше, може бути результатом активації аденілатциклазної системи під дією адреналіну. Проте, в умовах патології порушення кореляційної залежності вмісту вуглеводів в білку та рівня його модифікованих форм виявляється значно раніше (на 6 - 7 добу експерименту), тоді як під дією ДТ - на 30 добу, що свідчить про високу токсичність детергентів, хімічний склад яких обумовлює їх значну дію на структуру білка. Вміст модифікованих форм альбуміну корелює з даними, отриманими методом ДОО та ТПДС, що свідчить про зниження величини $-в_о$ до 224, а числа доступних пертурбації тирозилів до 4,3% порівняно з контрольними показниками ($-в_о$= 290 та 11% відповідно).

Таким чином, на підставі отриманих даних показано, що значне підвищення вмісту Ам в ранні строки дії детергентів та при експериментально викликаної патології зв'язано з рівнем вуглеводів в складі білка і, без сумніву, є підтвердженням їх модифікуючої дії.

Вивчення фізико-хімічних властивостей глікозильованих форм альбуміну людини

Незважаючи на велику зацікавленість дослідників що до оцінки ліганд-зв'язуючої здатності альбуміну, питання про глікозилювання цього білка до теперішнього часу залишається недостатньо вивченим і потребує більш докладного уточнення уявлення про його фізико-хімічні властивості. З цією метою нами була виділена глікозильована форма альбуміну за допомогою електрофорезу в тонкому шарі ПААГу з наступним фарбуванням на вуглеводи реактивом Шиффа. На рис.3 показана електрофореграма білків сироватки крові людини,

пофарбованих на білок та вуглеводи. За допомогою високочутливого барвника на білок R-250 в електрофоретичній фракції визначено 2 зони, які розрізняються за ступенем інтенсивності: значно більш офарбована (1) та менш офарбована (2). Фарбування реактивом Шиффа дозволило встановити наявність вуглеводних компонентів в зоні 2, тоді як в зоні 1 вони не визначаються. Одержані результати послужили підставою для препаративного поділення двох форм альбуміну: основної електрофоретичної фракції цього білка (1) та глікозильованих форм (2).

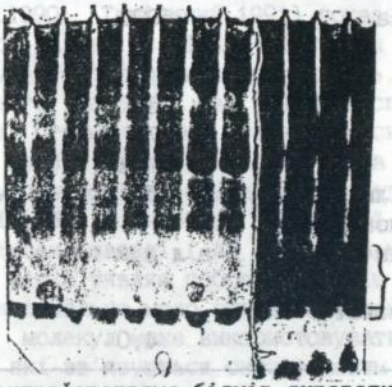


Рис. 3. Електрофореграма білків сироватки крові людини офарбованих на білок та вуглеводи
1- Основна фракція альбуміну
2- Глікозильовані форми альбуміну

Фізико - хімічні властивості препаративно виділених форм альбуміну наведені в таблиці 4.

На підставі даних імунофорезу виділених форм альбуміну показано, що обидві фракції за антигенними детермінантами є ідентичні альбуміну. Ізоелектричні спектри виділених форм альбуміну були вивчені методом електрофокусування у борат-поліольній системі з градієнтом pH 4,5 -7,0. Показано, що основна фракція альбуміну фокусується в межах pH 5,0 - 5,2, тоді як глікозильовані форми цього білка є більш гетерогенні та характеризуються зсувом ізоелектричного спектру в кислу зону (pI 4,75 ; 4,8 ; 4,85; 4,9).

При вивченні молекулярної ваги виділених форм альбуміну визначено,що основна фракція має молекулярну вагу 65000, а глікозильовані форми містять крім зони з молекулярною вагою 65000 ще й додаткові з молекулярною вагою 55000,40000 та 17000. При фарбуванні реактивом Шиффа глікозильованого альбуміну білкова форма з молекулярною вагою 65000 фарбується більш інтенсивно. В основній фракції альбуміну після обробки реактивом Шиффа вуглеводів не визначено. Застосування більш чутливого методу з використанням помічених пероксидазою лектинів дозволило виявити вміст вуглево-

Таблиця 4

Характеристика фізико-хімічних властивостей препаративно виділених форм альбуміну

Біохімічні показники	Основна фракція	Глікозильовані форми
Дані імунофорезу	альбумін	альбумін
Дані ізоелектрофокусування, pI	5,0 - 5,2	4,75, 4,8, 4,85, 4,9
Молекулярна вага	65000	65000, 55000, 40000, 17000
Параметри ДОО:		
- a_o	265	260
- b_o	275	260
H,%	47,4	46,7
Концентрація білка,%	45	10
Вуглеводні компоненти (з використанням лектинів)	галактоза: +	маноза +++
Вміст модифікованої форми, %	4,0	0,2

Примітка: знак + - ступінь прояву

дів в обох фракціях, причому з різною кількістю. Виявлено значне збільшення вуглеводів (+++) в глікозильованій формі порівняно з основною фракцією білка (+). Застосування лектинів дозволило зробити якісну оцінку наявності в складі глікозильованої форми таких вуглеводних компонентів як галактоза та маноза. Як відомо з даних літератури, при різних патологічних станах. Значна кількість вуглеводів міститься в модифікованому альбуміні (Борисенко,1983 ; Ажицький,1990). Мало інтерес визначити рівень модифікованого білка в складі виділених фракцій. Як видно з даних таблиці 2, вміст модифікованого альбуміну в основній фракції складає 4%, що узгоджується з даними літератури про кількість Ам в альбуміні донорів, тоді як в глікозильованій формі рівень Ам значно нижче та складає усього 0,2%. Оцінка структури виділених форм альбуміну дала можливість встановити, що показники ДОО основній та глікозильованої форми альбуміну практично не відрізняються і знаходяться в межах величин,характерних для альбуміну донорів згідно літературних даних.

Таким чином, на підставі вивчення фізико-хімічних властивостей виділених форм альбуміну отримано характеристики з ряду показників, які є різними для глікозильованої та основної форм альбуміну. Як видно з отриманих нами даних,глікозильована форма аль-

буміну має більшу електрофоретичну рухливість порівняно з основною фракцією білка і в своєму складі містить 4 білкові зони з різною молекулярною вагою. При цьому значний вклад у вміст вуглеводних компонентов вносить білкова зона з молекулярною вагою 65000, яка містить значну кількість галактози та манози. Як вже відзначалося раніше, з даних літератури відомо, що процес глікозилювання призводить до модифікації білка. Використання методу переосаджування альбуміну ТХУ -етанолом дозволяє відділити модифіковану форму від нативної, вміст якої в альбуміні здорових людей досягає 4%. В ряді робіт кафедри біохімії КМІ (Багдасар'ян,1980; Борисенко,1990; Троіцький,1991) показано,що ця фракція значно відрізняється за своїми фізико-хімічними властивостями від нативної: має меншу електрофоретичну рухливість, більш лужний характер ізоелектричного спектру та значно деспіралізована ($-\alpha_o$- 260±5; $-в_o$- 180±10). Отримані нами результати свідчать про те, що в глікозильованому альбуміні модифікована форма практично відсутня, що дає підставу припускати існування в складі електрофоретичної фракції альбуміну 3-х форм білка - нативної (Ан), модифікованої (Ам) та глікозильованої (Аг). Можна припускати, що модифікована частина білка уявляє собою популяцію старих, структурно змінених та функціонально мало активних молекул, тоді як частина непошкоджених молекул може використовуватися для транспорту основних лігандів, які зв'язуються сироватковим альбуміном. Також необхідно відмітити можливість участі глікозильованої форми альбуміну як маркера пізнавання в процесах внутрішньоклітинного протеолізу,що може мати велике значення при катаболізмі пошкоджених молекул білка в умовах розвитку патології або під дією на організм несприятливих факторів зовнішнього середовища.

Таким чином, проведені нами дослідження доповнюють уявлення, які є в літературі відносно фізико-хімічних властивостей глікозильованого альбуміну сироватки крові людини і мають певне значення у з'ясуванні біологічної ролі цієї форми білка в процесах детоксикації.

Висновки

1. В динаміці експерименту встановлено 2-х фазове зростання модифікованої форми альбуміну сироватки крові під дією на організм тварин різних ксенобіотиків.

2. Показано,що підвищення вмісту продуктів ПОЛ в сироватці крові тварин корелює з рівнем модифікованої форми альбуміну в різні відрізки експерименту.

3. Виявлено взаємозв'язок структурних змін сироваткового альбуміну (за даними ДОО та ТПДС) з показником вмісту модифікованих форм цього білка, рівень яких найбільш різко (в 8 разів) підвищен на 1 - 2 добу експериментальної патології порівняно з контрольною групою тварин.

4. Під дією зварювального пилу в ранні строки експерименту спостерігається збільшення кількості його складових елементів в сироватковому альбуміну, що супроводжується підвищенням рівня модифікованих форм.

5. Вміст модифікованих форм альбуміну є інформативним показником оцінки токсичності внаслідок дії на організм тварин різних детергентів та зварювального пилу.

6. Виявлено значне підвищення вмісту вуглеводів, зв'язаних з альбуміном сироватки крові в ранні строки експерименту під дією на організм тварин різних ксенобіотиків.

7. Ідентифіковано 3 форми сироваткового альбуміну (модифікована, нативна, глікозильована), з яких глікозильована форма характеризується більш високою електрофоретичною рухливістю, гетерогенністю зі зсувом ІЕС в кислу зону, значним вмістом манози та галактози.

Перелік робіт, що опубліковані за темою дисертації

1. Особенности сывороточного альбумина при экспериментальном миокардите и инфаркте миокарда // Депон.в ВИНИТИ N7029.-В 86,N 2, б/о 475 от 4.10.86.

2. Температурно - пертурбационные дифференциальные спектры альбумина крови при экспериментальной адреналиновой кардиомиопатии //" Физиология и патохимия органов дыхания и кровообращения."Труды Крымского мед. института,т.114.-Симферополь,1987.-С. 63-65 (соавт.А.В.Мазурец,К.П.Горелов,И.П.Вихарев).

3. Метод анализа углеводных компонентов непосредственно в сыворотке крови // 5 съезд биохимиков Украины,Киев,1987г.: Тез.докл.-Киев,1987.-С.264-265 (соавт.С.Н.Борисенко,Г.В.Троицкий).

4. Определение содержания модифицированных форм альбумина для оценки токсичности сварочных пылей //Докл.АН УССР.-1988.-N9.-С.64-65 (соавт. С.Н.Борисенко,В.Г.Войткевич,Ю.Ф.Гелескул,Г.В.Троицкий).

5. Влияние металлов кремний содержащих сварочных пылей на активность глутатионовой антиоксидантной системы в печени крыс // Докл. АН УССР.-1989.-N9.-С.59-60 (соавт. Ю.Ф.Гелескул, В.Г.Войткевич, И.И.Волкова).

6. Модификация альбумина крови сварочными пылями // 5 Всесоюзная конференция " Цитохром Р-450" и модификация молекул, Ялта,1989г.: Тез.докл.-Ялта,1989.-С.80 (соавт.С.Н.Борисенко, В.Г. Войткевич, Г.В. Троицкий).

7. Анализ биологической агрессивности сварочных пылей по состоянию перекисного окисления липидов // Украинский биохимический съезд,Киев,1992г.:Тез.докл.-Киев,1992.-С.150-151 (соавт.И.В.Крутикова,С.Н.Борисенко).

8. Цитотоксические свойства химически различных сварочных пылей и их способность активировать ПОЛ мембран //"Проблемы,достижения и перспективы развития медико-биологических наук и прак-

тического здравоохранения".Труды Крымского мед. института,Т.131.-Симферополь,1995.-С.77 - 82 (соавт. С.Н.Борисенко,Г.В.Ажицкий Г.В.Загорулько,И.В.Крутикова и др.).

9. Вільно- радикальне окислення як фактор структурно-функціональних порушень альбуміну крові /VII Український біохімічний з'їзд, Київ, 1997р.: Тез.доп.-Київ,1997.-С.-113 - 114 (співавт.І.В.Крутикова; Г.Ю.Ажицький; Г.В.Загорулько).

Анотація

Головська Г.Г." Структурно - функціональна характеристика змін альбуміну крові під дією різних ксенобіотиків на організм тварин".- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія - Кримский медичний інститут ім. С.І.Георгієвського,1997.

В роботі вивчено ступінь модифікації альбуміну крові в динаміці експерименту під дією різних варіантів зварювального пилу та детергентів.Встановлено 2-х фазові зміни рівня модифікованих форм альбуміну, які супроводжуються значною інтенсифікацією процесів ПОЛ в плазмі крові тварин, що дозволює використовувати ці показники як інформативний тест при оцінки токсичності ксенобіотиків. Визначена кореляція у вмісті елементів, що входять в склад зварювального пилу, та вуглеводів, лігандованих альбуміном крові в різні строки експерименту,свідчить про їх модифікуючу дію на білок. Показано, що глікозильовані форми альбуміну відрізняються з ряду фізико-хімічних характеристик від нативної та модифікованих форм білка.

Ключові слова: структурні зміни альбуміну сироватки крові,ксенобіотики,експеримент,глікозильовані форми білка.

Аннотация

Головская Г.Г. " Структурно - функциональная характеристика изменений альбумина крови при воздействии различных ксенобиотиков на организм животных."- Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Крымский медицинский институт им. С.И. Георгиевского, 1997.

В работе изучена степень модификации альбумина крови в динамике эксперимента при воздействии различных сварочных пылей и детергентов. Установлено 2-х фазовое изменение уровня модифицированных форм альбумина,сопровождающееся выраженной интенсификацией процессов ПОЛ в плазме крови животных, что позволяет использовать эти показатели как информативный тест при оценке токсичности ксенобиотиков. Выявленная корреляция в содержании элементов,составляющих сварочные пыли и углеводов, лигандированных альбумином крови в разные сроки эксперимента, свидетельствует о модифицирую-

щем их действии на белок. Показано, что гликозилированные формы альбумина отличаются по ряду физико - химических характеристик от нативной и модифицированной форм белка.

Ключевые слова: структурные изменения сыворотки крови, ксенобиотики, эксперимент, гликозилированные формы белка.

Annotation

Golovskaja G.G. The strukture - functional characters of changes in blood albumin under influence of different ksenobiotics on animal's organism.-Manuscript.

Thesis for a scientific degree of candidate of sciences by speciality 03.00.04 -biochemistry.- S.I.Georgievsky Crimea medical institute, Simferopol, 1997.

In this thesis the degree of albumin modification has been studied in the dynamics of experiment under influence different welding dust and detergents. Two phases of changes were shown in the level of modificated form of albumin, which are accompanied by expressed intensification of lipid peroxidation processis (POL) in animal's blood plasma, and that allow to use these indexes as informative test for estimation of ksenobiotic's toxicity.

The correlation was shown in the contents of welding dust elements and carbohydrates as ligands of serum albumin in the different experimental terms, that evidences about them modificative action on the protein.

It has been shown, that glucosilated albumin's forms are differed from native and modificated form of protein by some physico-chemical characters.

Key words: structure changes of serum albumin, ksenobiotics, experiment, glicosilated albumin's forms.

430998

Ав 39.110

Надруковано у фірмі "Свифт"
Проспект Кірова,34
тел. 25-83-28
Брошура видана у кількості
100 примірників