

А.В.Козлов, А.Томази, А.Мазини*, Ю.А.Владимиров*

СВОБОДНОЕ ЖЕЛЕЗО В ИНТАКТНЫХ ТКАНЯХ КРЫСЫ И ЕГО НАКОПЛЕНИЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОХРОМАТОЗЕ. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Российский государственный медицинский университет, Москва;

* Моденский университет, Модена, Италия

FREE FERROUS IONS IN INTACT RAT TISSUES AND THEIR ACCUMULATION DURING EXPERIMENTAL HEMOCHROMATOSIS. THE ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE STUDY

A.V.Kozlov, A.Tomasi, A.Masini, Y.A.Vladimirov

Summary

The possibility of intracellular free iron registration by the electron paramagnetic resonance method with desferal use as iron chelator was demonstrated in the study. The essential increase of desferal available iron was found in liver, kidney, and spleen during experimental hemochromatosis. Heart, lungs, and brain were more resistant to free iron accumulation.

Резюме

В работе была продемонстрирована возможность регистрации внутриклеточного свободного железа методом электронного парамагнитного резонанса с применением хелатора железа десферала. При экспериментальном гемохроматозе обнаружено существенное увеличение концентрации доступного десфералу железа в печени, почках и селезенке. Сердце, легкие и мозг оказались более резистентными к накоплению свободного железа.

Перегрузка железом при гемохроматозе сопровождается существенным увеличением содержания железа в тканях. Эта ситуация может быть смоделирована в эксперименте при содержании крыс на диете, включающей избыток железа [4]. Содержание животных на такой диете приводит к увеличению количества железа в тканях [7,8,10,12]. Вместе с тем имеются наблюдения, что накопление продуктов перекисного окисления липидов и продуктов деградации белков, обнаруживаемых в плазме крови и печени, бывает лишь тогда, когда концентрация железа в печени превышает 2000—3000 мг/кг ткани (что достигается содержанием крыс на насыщенной железом диете в течение 3—6 месяцев) [3,5,6,9]. Известно, что как перекисное окисление, так и деградация белков чаще всего являются следствием появления каталитически активного свободного железа. В связи с этим можно было предположить, что на ранних стадиях пул свободного железа в ткани не увеличивается, поскольку поступающее железо связывается ферритином и другими железотранспортными белками. На более поздних стадиях, когда эти белки насыщаются, количество железа в свободном пуле увеличивается и как следствие проявляется его токсичность.

В отличие от ионов, связанных в макромолекулах или с низкомолекулярными комплексами, ионы свободного железа быстро связываются с такими хелаторами, как десферал, фенантролин, а также окись азота, которая образует с ионами Fe^{2+} парамагнитные нитрозильные комплексы [1,11,13,14]. Из перечисленных хелаторов наименьшим токсическим воздействием на организм обладает десферал. Что же касается окиси азота, то она легко проникает в ткани и образует там комплексы с ионами железа и SH-группами. Фенантролин является токсичным и не проникает в ткани.

Учитывая перечисленные свойства хелаторов, мы использовали в наших исследованиях десферал. Этот выбор был основан на следующих соображениях. Во-первых, этот комплексон образует достаточно прочные комплексы с ионами железа. Во-вторых, образующийся комплекс обладает характерным спектром электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Кроме того, десферал имеет крайне низкую токсичность и способен проникать сквозь клеточные мембраны.

Целью этой работы было обнаружить наличие или отсутствие в биологических тканях ионов свободного железа, сходных по своим свойствам с ионами железа,

используемыми в модельных системах для активации свободнорадикальных процессов. А также выяснить вопрос о том, накапливаются ли ионы железа, обладающие редоксактивностью при экспериментальном гемохроматозе в тканях крысы.

В работе были использованы белые крысы линии Вистар весом 100—150 г. Перегрузку железом моделировали добавлением в диету 2,5% карбоната железа. Животных выводили из опыта с помощью эфира, декапитировали.

Органы, извлеченные у крысы, промывали в 0,9% NaCl и готовили из них либо образцы для ЭПР-спектрометра, либо гомогенат. Гомогенат готовили в 10 mM ТРИС буфере (pH=7,4), содержащем 120 mM KCl в соотношении ткань:буфер=1:2 (вес/объем).

Образцы тканей, гомогенатов или исследуемые растворы замораживали в специальной форме, соответствующей по размерам сосуду Дьюара, в котором проводили измерения при температуре жидкого азота [11].

Спектры ЭПР записывали на спектрометрах "Varian E-4" и "Brucker 200" при следующих условиях: частота клистрона — 9,12 ГГц, мощность 20 мВт, амплитуда модуляции 2,0 мТл.

Оптические спектры комплексов Fe—десферал записывали на спектрофотометре Beckman DU-7. О количестве комплексов судили по оптической плотности при 430 нм [2].

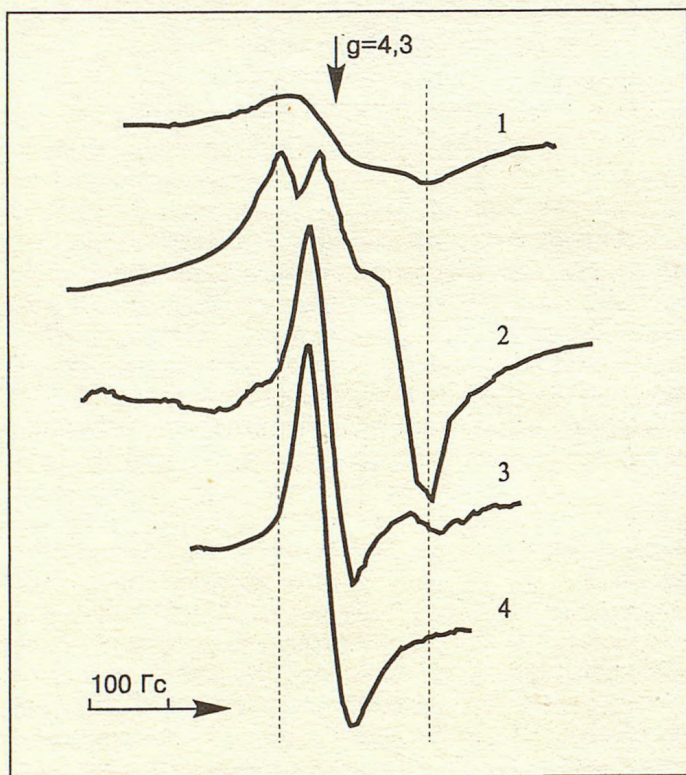


Рис.1. Спектры ЭПР интактной печени (1), трансферрина (2), печени, выделенной у животного, которому был введен десферал (3), и раствора, содержащего 1 mM десферала и 40 μ M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4). Десферал, в дозе 100 мг/кг массы вводили за 20 мин до декапитации и извлечения печени. Хранение образцов и запись спектров ЭПР проводили при температуре жидкого азота.

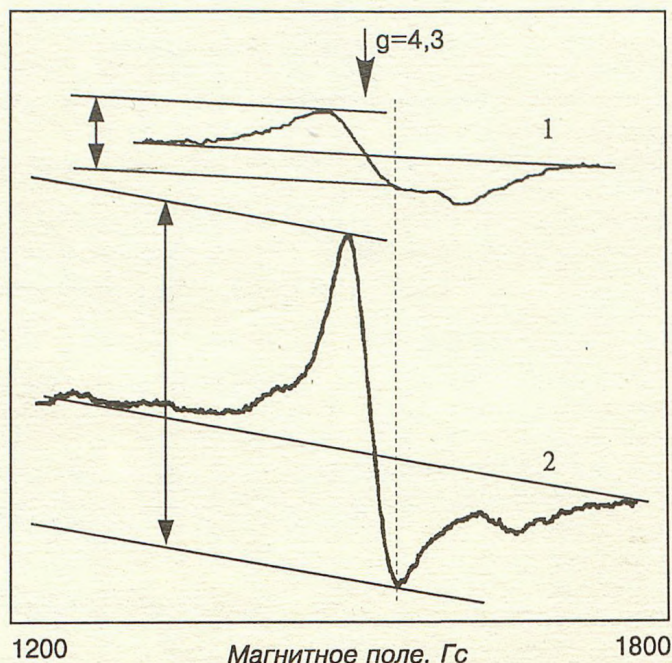


Рис.2. Расчет амплитуд сигналов ЭПР интактной печени крысы (1) и печени, выделенной у крысы, которой предварительно был введен десферал (2). Стрелками показано как измеряли амплитуды сигналов.

Другие детали эксперимента описаны в подписях к рисункам.

При статистической обработке рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение по общепринятым формулам.

На рис.1 приведены спектры ЭПР интактной печени крысы, трансферрина крови, печени крысы, которой за 20 мин до декапитации был введен десферал, а также раствора, содержащего десферал и ионы железа.

На рисунке видно, что интактная печень в области $g=4,3$ обладает небольшим по амплитуде сигналом ЭПР, совпадающим по форме с трансферрином крови. Введение десферала приводит к образованию довольно интенсивного сигнала ЭПР, который совпадает по форме со спектром комплексов десферала с железом, полученных в растворе. По амплитуде этого сигнала можно судить о количестве свободного железа в ткани.

Для количественной оценки содержания комплексов Fe — десферал в ткани использовали два образца: один из которых был интактной печенью, другой — печенью животного, которому был введен десферал. Амплитуды сигналов измеряли, учитывая наклон базовой линии, связанный с присутствием кислорода, как показано на рис.2. Затем вычитали амплитуду сигнала интактной печени из амплитуды, полученной для печени, обработанной десфералом.

В предыдущем эксперименте десферал был введен крысам внутрибрюшинно. При этом нельзя было исключить, что парамагнитные комплексы с $g=4,3$ образовались не в печени, а были принесены туда с током крови. Для прояснения этого вопроса мы изучали образование этих комплексов в перфузируемой печени крысы. Десферал вводили в перфузионную среду, а

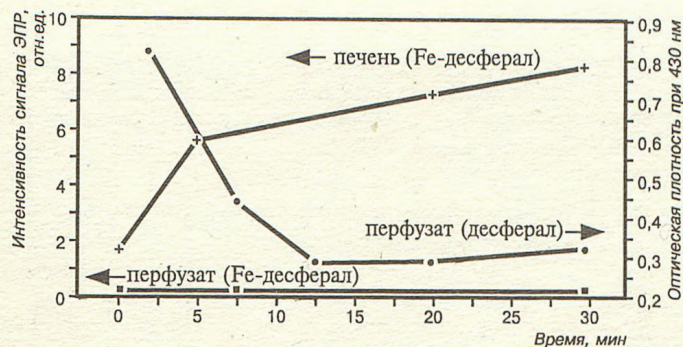


Рис.3. Кинетика образования парамагнитных комплексов с $g=4,3$ в перфузируемой печени крысы. Перфузию проводили по замкнутому контуру через воротную и нижнюю полую вены. Перфузионная среда включала раствор Хенкса, содержащий 0,5 мМ десферала. Для оценки содержания комплексов Fe—десферал измеряли интенсивность сигнала ЭПР с $g=4,3$ в ткани печени либо в перфузионной среде. Для определения количества свободного десферала к перфузионной среде добавляли избыток FeCl_3 (5 мМ) и измеряли оптическую плотность при 430 нм.

затем измеряли интенсивность сигнала ЭПР с $g=4,3$ в ткани печени и в перфузионной среде. Затем в перфузионную среду добавляли избыток ионов железа в виде раствора FeCl_3 и по оптическому спектру определяли количество свободного десферала.

Как видно из рис.3, концентрация десферала, не связанного с железом, быстро снижалась в первые 10 мин после начала перфузии, при этом комплексов Fe—десферал в перфузате обнаружено не было. Что же касается ткани печени, то там уже через 5 минут после начала перфузии появлялся сигнал, характерный для комплексов Fe — десферал. Этот эксперимент свидетельствует о том, что десферал проникает в клетки печени и там хелатирует ионы Fe, образуя парамагнитные комплексы.

Таким образом, введение десферала позволяет обнаружить в ткани парамагнитные комплексы ионов железа. Точно такой же сигнал обнаруживается при введении десферала в гомогенат ткани. Однако ампли-

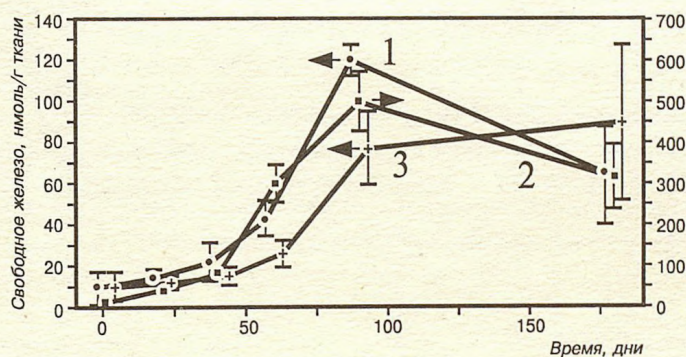


Рис.4. Динамика накопления свободного железа в тканях крысы при экспериментальном гемохроматозе. Гемохроматоз моделировали держа крыс на диете, содержащей 2,5% карбонила железа. Через определенные промежутки времени крыс забивали, извлекали органы, которые немедленно замораживали в жидком азоте, затем готовили гомогенаты, в которые вводили 1 мМ десферала, инкубировали 10 мин и готовили образцы. Спектры ЭПР записывали при температуре жидкого азота. 1 — почка (левая ось), 2 — печень (правая ось), 3 — селезенка (левая ось).

туда этого сигнала уменьшалась пропорционально отношению ткань:буфер при приготовлении гомогената.

Полученные результаты говорят о том, что железо, доступное десфералу, присутствует в ткани *in vivo* (эксперимент с введением десферала крысам), что это железо локализовано внутри клеток (эксперимент с перфузируемым органом). Это же железо может быть обнаружено в гомогенате ткани.

Наиболее драматические изменения в метаболизме железа наблюдаются при гемохроматозе, когда общее содержание железа в тканях стремительно увеличивается. Однако, как говорилось выше, не ясно, увеличивается ли при этом пул свободного железа или же все накопленное железо хранится в ферритине. Для ответа на этот вопрос нами была изучена динамика изменения содержания свободного железа в различных тканях при экспериментальном гемохроматозе. Результаты этих измерений в печени, почках и селезенке приведены на рис.4. Аналогичные измерения были проведены в ткани мозга, легких и сердца. Эти результаты представлены на рис.5.

Как видно из рис.4 и 5, все исследованные ткани можно разделить на две группы. Первая группа включает печень, почки и селезенку, где накапливается наибольшее количество свободного железа. В этих тканях количество доступного десфералу железа достигает максимума к 90-му дню содержания животных на диете, включающей избыток железа. К другой группе тканей можно отнести ткани мозга, легких и сердца, в которых пул свободного железа при экспериментальном гемохроматозе существенно не увеличивается. Достоверные различия появляются лишь в легких и мозге через 180 дней после начала эксперимента.

На наш взгляд, следует отметить три наиболее важных момента, вытекающих из этой работы. Во-первых, комбинация экспериментов *in vivo* с результатами, полученными на перфузируемой печени и в гомогенате, показывают что десферал-доступное железо присутствует во всех трех объектах, то есть оно не является следствием препаративных процедур. Во-вторых, нами была измерена концентрация свободного железа в гомогенатах шести тканей, не разделенных на фракции. Наконец, в-третьих, удалось разделить

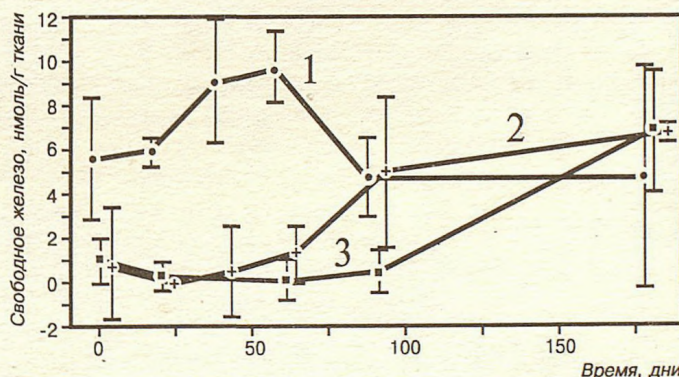


Рис.5. Динамика накопления свободного железа в тканях крысы при экспериментальном гемохроматозе. Условия эксперимента описаны в предыдущем рисунке. 1 — сердце, 2 — легкие, 3 — мозг.

исследуемые ткани на чувствительные и нечувствительные к перегрузке железом. В первую группу попали печень, почки и селезенка, а во вторую — сердце, легкие и мозг.

Вместе с тем, в настоящее время остается неясным, является ли накопление доступного десфералу железа в тканях маркером повреждения ткани или эта взаимосвязь носит более сложный характер. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А.Ф. // Биохимия. — 1967. — Т.32. — С.277—282.
2. Козлов А.В., Егоров Д.Ю., Владимиров Ю.А. и др. // Журн. физ. химии. — 1990. — Т.64. — С.225—227.
3. Bacon B.R., Tavill A.S., Brittenham G.M. et al. // J. Clin. Invest. — 1983. — Vol.71. — P.429—439.
4. Bacon B.R.O., Neill R. // Hepatology. — 1985. — Vol.5. — Abstr. 13.
5. Bacon B.R., Healey J.F., Brittenham G.M. et al. // Gastroenterology. — 1986. — Vol.90. — P.1844—1853.

6. Bacon B.R., Britton R.S., O'Neill R. // Hepatology. — 1989. — Vol.9. — P.398—404.
7. Ceccarelli D., Predieri G., Muscatello U. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1991. — Vol.176. — P.1262—1268.
8. Figueiredo M.S., Baffa O., Neto J.B. et al. // Res. Exp. Med. — 1993. — Vol.193. — P.27—37.
9. Galleano M., Puntarulo S. // Toxicology. — 1992. — Vol.76. — P.27—38.
10. Iancu T.C., Shiloh H., Link G. et al. // Br. J. Exp. Pathol. — 1987. — Vol.68. — P.53—65.
11. Kozlov A.V., Yegorov D.Yu., Vladimirov Yu. A. et al. // Free Radical Biol. Med. — 1992. — Vol.13. — P.9—14.
12. Masini A., Trenti T., Ventura E. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1984. — Vol.124. — P.462—469.
13. Vanin A.F., Osipov A.N., Kubrina L. N. et al. // Stud. Biophys. — 1975. — Vol.49. — P.13—25.
14. Yegorov D. Y., Kozlov A.V., Azizova O.A. et al. // Free Radical Biol. Med. — 1993. — Vol.15. — P.565—574.

Благодарность. Работа частично была поддержана Европейским научным обществом (ESF grant № RF/93/35 (T)).

Поступила 26.12.94.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 612.111.11.015.3

Э.В.Брюханова, А.Н.Осипов, Ю.А.Владимиров

ВЛИЯНИЕ ГАПТОГЛОБИНА НА СПОСОБНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА РАЗЛАГАТЬ ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА С ОБРАЗОВАНИЕМ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Российский государственный медицинский университет, Москва

THE HAPTOGLOBIN EFFECT ON HAEMOGLOBIN MEDIATED DECOMPOSITION OF HYDROGEN PEROXIDE YIELDING FREE RADICALS

E.V.Brukhanova, A.N.Osipov, Y.A.Vladimirov

S u m m a r y

The effect of haptoglobin on H_2O_2 dependent chemiluminescence (ChL) of native and modified with H_2O_2 or HOCl haemoglobin was studied. It was shown that haptoglobin decreases the native haemoglobin ChL intensity and the number of radicals formed during the reaction of haemoglobin with H_2O_2 . It was supposed that the effect of haptoglobin is conditioned primarily by the haemoglobin catalytic activity decrease through Hp—Hg complex formation. It was shown that haptoglobin inhibits effectively H_2O_2 -dependent ChL of both native and preincubated with H_2O_2 or HOCl haemoglobin.

Р е з ю м е

Изучено влияние гаптоглобина на H_2O_2 -зависимую хемилюминесценцию (ХЛ) нативного гемоглобина и гемоглобина, модифицированного H_2O_2 или HOCl. Показано, что гаптоглобин уменьшает интенсивность ХЛ нативного гемоглобина и количество радикалов, образующихся при взаимодействии гемоглобина с H_2O_2 . Предположено, что это влияние гаптоглобина обусловлено прежде всего уменьшением каталитической активности гемоглобина путем образования Hp—Hg комплекса. Было показано, что гаптоглобин одинаково эффективно ингибирует H_2O_2 -зависимую ХЛ как нативного гемоглобина, так и гемоглобина, преинкубированного с избытком H_2O_2 или HOCl.