

*Биология*

УДК 577.34, 537+598.1

Н. М. АЙВАЗЯН, Н. А. ЗАКАРЯН, Т. А. МЕГРАБЯН, А. Е. ЗАКАРЯН

ДЕЙСТВИЕ ТОКСИНА ЗАКАВКАЗСКОЙ ГЮРЗЫ (*Vipera lebetina obtusa*)  
НА СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ НЕРВНОЙ  
ТКАНИ ПОЗВОНОЧНЫХ

Методами хемилюминесценции и спектрофотометрического определения концентрации малонового диальдегида изучали влияние яда *Vipera lebetina obtusa* на уровень свободнорадикального окисления тканевых гомогенатов и общих липидов, выделенных из нервной ткани пойкилотермных и гомойотермных позвоночных. Показано, что действие токсина приводит к ингибированию данного процесса, что вероятно объясняется антиоксидантным механизмом взаимодействия. Проявление антиокислительного эффекта неодинаково для изученных организмов, что может быть связано со степенью насыщенности липидов исследуемой ткани у различных представителей позвоночных.

**Введение.** В последние годы в медицине и фармацевтической промышленности широко применяются зоотоксины, в том числе змеиные яды, являющиеся сильнодействующими биологически активными веществами [1,2]. При этом механизмы взаимодействия подобных веществ и их составляющих с различными тканевыми системами с высоким уровнем функциональной специфичности изучены недостаточно. Согласно указаниям научной литературы, основной акцент ставится на специфику действия ядов на кровеносную систему организма и развивающуюся в связи с этим картину глубоких нарушений с соответствующими клиническими проявлениями [3]. Что касается данных о тонких молекулярно-биологических и биохимических отклонениях, отражающих специфичность этиопатогенетических механизмов вредоносного действия змеиного яда на системы регуляции клеточной активности отдельных органов, систем и целостного организма, то они по сей день остаются противоречивыми. Однако в последнее время встречаются сведения о характере влияния змеиных токсинов и их отдельных составляющих на мембранные структуры [4], хотя нередко обнаруживается разнотой в действиях фракционированных компонентов по сравнению с особенностями их влияния в составе цельного яда [5]. Вот почему, несмотря на относительную

изученность биохимического состава зоотоксинов, механизмы действия их составляющих все еще остаются недостаточно выясненными. В качестве индикаторов физиологического состояния биомембран, чувствительных к малейшим отклонениям в интактных клетках, могут выступать процессы свободнорадикального окисления (СРО) липидов и хемилюминесценции (ХЛ), что и стало предметом специальных исследований в настоящей работе [6].

Нами изучено действие токсина закавказской гюрзы (*Vipera lebetina obtusa*) на указанные процессы в нервной ткани некоторых представителей высших позвоночных.

**Материалы и методы.** Материалы для исследований были получены из обыкновенного карася (*Carassius carassius*), озерной лягушки (*Rana ridibunda*), кавказской агамы (*Stellio caucasicus*) и беспородных белых крыс обоего пола. После декапитации отделяли головной мозг, фракцию общих липидов выделяли по методике, описанной ранее [7]. Следы хлороформ-метанола удаляли с помощью вакуумного испарителя, затем липидный осадок растворяли в 3%-ом растворе нонана. Исследования на гомогенатах мозговой ткани проводились в буферном растворе (0,175 М КСl, 0,025 М трис-НСl, рН 7,4) с конечной концентрацией 20 мг сырой ткани на 1 мл буфера. Лиофильно высушенный токсин *Vipera lebetina o.* (DL50= 4,5 мг/кг) также растворяли в вышеуказанном буфере до концентрации  $3 \cdot 10^{-5}$  М. Обработку образцов зоотоксином производили инкубированием их в указанном буфере при 37<sup>0</sup>С в течение 10 мин, причем липиды обрабатывали перед добавлением нонана. Измерение интенсивности ХЛ проводили с помощью квантометрической установки, работающей на базе фотоэлектронного умножителя ФЭУ-139 с диапазоном спектральной чувствительности 300–800 нм [8]. Раствор ZnCl (0,1 М, 0,2 мл) добавляли в пробу для хемилюминесценции сразу перед измерением. Об активности течения процесса СРО липидов судили по интенсивности окрашивания в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест). Содержание продуктов перекисления определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 532 нм [9].

Статистическую обработку полученных результатов, представленных в виде М±S.E.M., осуществляли с применением критерия Стьюдента–Фишера.

**Результаты и обсуждения.** Согласно данным, отраженным на рис. 1, накопление малонового диальдегида (МДА) в мозговой ткани в норме и после обработки раствором змеиного яда для холоднокровных животных и гомойотермных позвоночных происходит неодинаково. Если для крыс имеет место подавление процессов СРО липидов, то в гомогенатах нервной ткани карася, лягушки и ящерицы под действием яда происходит значительное активирование реакции образования МДА, свидетельствующее об интенсификации указанных процессов. Согласно имеющимся литературным данным, отмечают существенные расхождения в клинической картине при действии яда различных представителей гадюковых, в том числе и гюрзы, обусловленные неодинаковым уровнем теплокровности организмов, подверженных их воздействию [10]. Наиболее изученными в этом смысле являются отдельные представители млекопитающих, у которых сублетальные дозы токсина *Vipera lebetina* демонстрируют радиопротекторный эффект [3]. Ранее нами

было показано изменение уровней процессов свободнорадикального окисления в аспекте филогенетического развития позвоночных [9, 11].

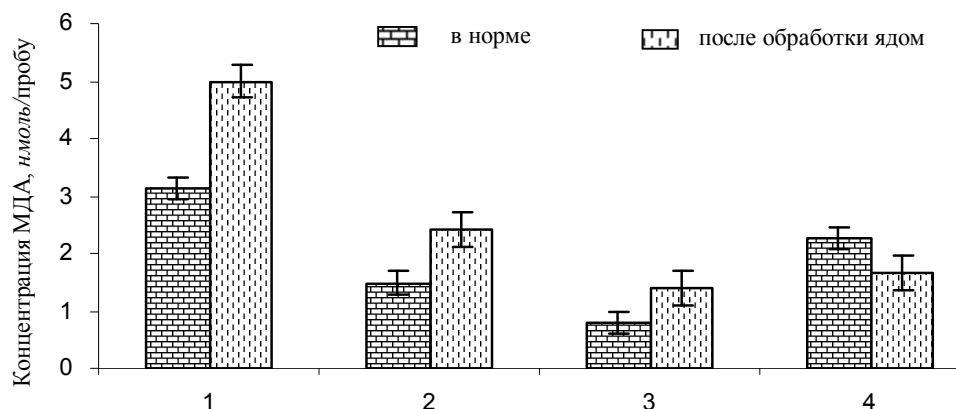


Рис. 1. Изменение уровня перекисного окисления липидов нервной ткани позвоночных под влиянием яда гюрзы. 1 – карась, 2 – лягушка, 3 – ящерица, 4 – крыса.

Изучение процессов спонтанной ХЛ в тканевых гомогенатах указанных объектов до и после обработки их змеиным ядом (см. таблицу), в отличие от предыдущего опыта, выявило антиоксидантный эффект в нервной ткани всех исследованных представителей позвоночных, кроме карася, в мозговом гомогенате которого наблюдалось значительное усиление процессов свечения на фоне интоксикации. Действие зоотоксина на ХЛ чистых липидных фракций также выявило антиоксидантный эффект змеиного яда для всех изученных животных. При этом собственное свечение растворителя нонана, незначительно превышающее фоновое свечение квантометрической установки, не оказывало существенного влияния на ход ХЛ-анализа. Уровни спонтанной ХЛ и глубина взаимодействия липидов с понижающими ХЛ компонентами токсина, по-видимому, напрямую зависят от биохимического состава липидов, от степени их ненасыщенности. Подтверждением тому может служить наибольший уровень свечения липидных фракций рыб, богатых полиненасыщенными жирными кислотами, в отличие от липидов земноводных и пресмыкающихся, которые содержат более насыщенные жирные кислоты [12] в сочетании с несравненно высоким уровнем холестерина, являющегося по существу структурным антиоксидантом.

*Интенсивность ХЛ тканевых гомогенатов и липидов мозга некоторых позвоночных в норме и после обработки их ядом Vipera lebetina*

Вид	ХЛ, имп./10 с			
	гомогенат		липиды	
	норма	после обработки	норма	после обработки
Карась	124 ± 15,7	175 ± 21,7	95 ± 4,18	80 ± 2,35
Лягушка	67 ± 4,47	56 ± 1,24	59 ± 6,86	45 ± 2,13
Агама	55 ± 3,75	49 ± 2,26	77 ± 2,78	70 ± 1,88
Крыса	58 ± 4,18	43 ± 2,78	83 ± 2	77 ± 3,15

Различия данных ХЛ-анализа и результатов ТБК-теста для крыс, по всей вероятности, обусловлены методическими особенностями, связанными с

участием в реакции образования МДА только ди- и полиеновых жирных кислот. Вклад мононенасыщенных жирных кислот в образование пула МДА в ходе ТБК-теста незначителен, в то время как продукт их окисления – гидроперекиси – влияют на уровень ХЛ.

Согласно клиническим проявлениям, картина влияния токсина *Vipera lebetina* на тканевые мембраны характеризуется развитием местного отека, постепенно распространяющегося по мере всасывания яда в кровь. Этот эффект по сей день приписывается исключительно действию в составе яда фосфолипазы А2 – фермента, катализирующего процесс отщепления эфирной связи полиненасыщенных жирнокислотных остатков от молекулы липида [3, 5]. Таким образом, можно предположить, что специфика действия данного компонента токсина *Vipera lebetina*, ответственного за обеспечение радиопротекторного эффекта, у крыс проявляется на уровне именно моноеновых жирных кислот, в отличие от других биологических объектов – носителей мононенасыщенных и насыщенных жирных кислот (в основном типа невроновой и стеариновой) [12].

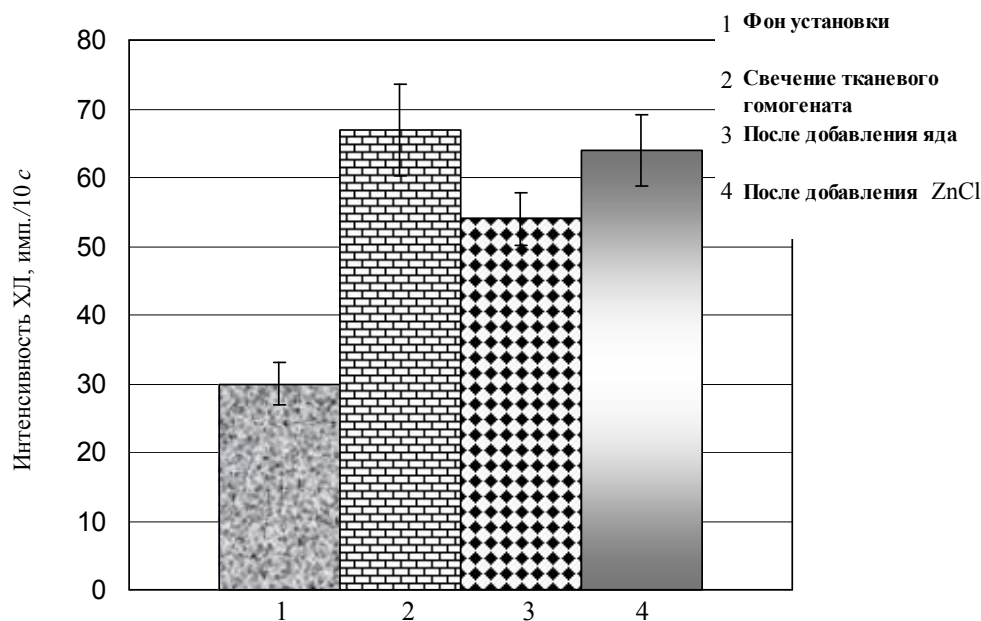


Рис. 2. Влияние яда *Vipera lebetina obtusa* и ионов цинка на активность свободнорадикальных процессов в мозговой ткани млекопитающих.

В нашей лаборатории также были проведены исследования, позволяющие говорить о важной роли ионов Zn в составе яда при воздействии последнего на окислительные процессы в липидных структурах тканей организма (рис. 2). Как видно из рисунка, при добавлении ZnCl<sub>2</sub> после яда гюрзы ионы цинка в значительной степени снимают эффект яда. При этом свечение пробы возвращается почти к исходному уровню ХЛ гомогената (до обработки ядом). Обнаруженный недавно в составе яда гюрзы Zn-хелатирующий компонент обтустатин, богатый цистеином, в некоторой степени подтвердил наши догадки относительно антиокислительного характера взаимодействия

яда гюрзы с тканями, в котором особая роль отводится ионам Zn [13, 14, 15]. Поэтому не исключено, что в механизме действия изученного токсина *Vipera lebetina* на липидные компоненты мембран нервной ткани фигурирует проявление комплексного эффекта различных составляющих яда в виде ряда фосфолипаз, ионов Zn и других факторов, наделенных антиокислительной активностью.

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что яд закавказской гюрзы, являясь весьма сложным по своему химическому составу биологически активным веществом, взаимодействует с мембранами нервных клеток и приводит к понижению уровня окислительных процессов их липидных компонентов в зависимости от степени ненасыщенности последних.

Кафедра биофизики

Поступила 12.11. 2007

#### ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newcomb R., Suzuke B., Palma A. et al. – Biochemistry, 1998, v. 37, № 4, p. 15353–15362.
2. Peter M., Varga Z. et al. – Biochem. & Biophys. Res. Commun., 1998, v. 242, № 3, p. 621–625.
3. Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б., Ибрагимов А.К. Ядовитые животные и растения СССР. М.: Высшая школа, 1990, 272 с.
4. Harvey Alan L. – Gen. Pharmacol., 1997, v. 28, № 1, p. 7–12.
5. Сахибов Д.Н., Сорокин В.М., Юкельсон Л.Я. Химия и биохимия змеиных ядов. Ташкент: Фан, 1972, 185 с.
6. Avvazian N.M., Zakharian A.E., Ovakimian M.E. 12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Russia, St.Petersburg, 2003, p.32–33.
7. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. – Докл. РАН, 2003, т. 388, № 1, с. 1–3.
8. Закарян А.Е., Цагикян А.Р., Погосян Г.П. – Биол. журн. Армении, 1990, № 1, с. 51–54.
9. Айвазян Н.М., Закарян А.Е., Карагезян К.Г. – Нейрохимия, 2002, т. 19, № 4, с. 284–287.
10. Kardong K.V. – Herp., 1996, v. 52, № 1, p. 36–46.
11. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. – Докл. РАН, 2000, т. 374, № 1, с. 111–114.
12. Забелинский С.А., Чеботарева М.А., Кривченко А.И. – Ж. эвол. б/х и физиол., 2000, т. 36, № 3, с. 202–209.
13. Bdolah A., Kinamon S., Wollberg L., Kochva E. – Toxicon., 1997, v. 35, № 4, p. 478–479.
14. Suzuke K., Nakamura M., Hafanaka Y. et al. – J. Biochem., 1997, v. 122, № 6, p. 1260–1264.
15. Masuda Sh., Hayashi H., Akari S. – Eur. J. Biochem., 1998, v. 253, № 1, p. 36–41.

Ն. Մ. ԱՅՎԱԶՅԱՆ, Ա. Ե. ԶԱԲԱՐՅԱՆ, Տ. Ա. ՄԵՀՐԱԲՅԱՆ, Ն. Ա. ԶԱԲԱՐՅԱՆ

*Vipera lebetina obtusa* ՕՁԻ ԹՈՒՅՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ՈՂՆԱՇԱՐԱՎՈՐՆԵՐԻ ՆՅԱՐԴԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ  
ԱԶՍ ՌԱԴԻԿԱԼԱՅԻՆ ՕԶՍԻԴԱՅՄԱՆ ՎՐԱ

#### Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է քիմլյումինեսցենցիայի և մալոնային երկալդեհիդի կոնցենտրացիայի սպեկտրալուսաչափական որոշման մեթոդներով *Vipera lebetina obtusa* օձի թույնի ազդեցությունը սառնարյուն և տաքարյուն ողնաշա-

րավորների նյարդային հյուսվածքից անջատված հոմոգենատների և ընդհանուր լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վրա: Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ թույնի ազդեցությունը հանգեցնում է նշված պրոցեսների մակարդակի նվազմանը, ինչը, հավանաբար, պայմանավորված է փոխազդեցության մեխանիզմի հակաօքսիդիչային բնույթով: Տվյալ էֆեկտը միևնույնը չէ բոլոր ուսումնասիրված օրգանիզմների համար, ինչը, հավանաբար, կախված է տարբեր ողնաշարավորների հետազոտվող հյուսվածքի լիպիդների ճարպաթթուների հագեցվածության աստիճանից:

N. M. AYVAZIAN, A. E. ZAKHARIAN, T. A. MEGHRABYAN, N. A. ZAKHARIAN

*Vipera lebetina obtusa* VENOM ACTION ON FREE-RADICAL  
OXIDATION OF LIPIDS IN NERVOUS TISSUE OF VERTEBRATES

Summary

Influence of *Vipera lebetina obtusa* venom on level of free-radical oxidation of homogenates and lipids, purified from nervous tissue of poikilothermal and homothermal vertebrates was studied using chemiluminescence and spectrophotometric measurement of malonic dialdehyde concentration. It was shown that action of toxin leads to inhibition of this process, which probably is accounted for antioxidant mechanism of interaction. Manifestation of this effect is not similar for every of studied organisms. This phenomenon may be related to the degree of saturation in fatty acids of lipids in researched tissue of different vertebrates.