THERMOSTABLE SUPEROXIDE-PRODUCING COMPLEX BETWEEN NADPH-CONTAINING LIPOPROTEIN (NCL) AND Fe (III) FROM BOILED COW MILK: ACTIVATION OF IMMUNE CELLS NADPH OXIDASE BY NCL IN VITRO

RUZANNA SIMONYAN
H. Buniatyan Institute of Bochemistry NAS RA,
PhD, Researcher, Lab Head
ruzan.simonyan@gmail.com

KAREN SIMONYAN
Orbeli Institute of Physiology NAS RA,
PhD, Senior Researcher
karensimonyan86@gmail.com

GEGHAM SIMONYAN
H. Buniatyan Institute of Biochemistry NAS RA,
PhD, Researcher
gegasim@mail.ru

GAYANE MARMARYAN
Armenian National Agrarian University,
PhD, DSc, Researcher, Head of Department
gmarmaryan@gmail.com

ARMINE ISOYAN
Orbeli Institute of Physiology NAS RA,
PhD, Researcher
isoyanarmin@gmail.com

LILIT DARBINYAN
Orbeli Institute of Physiology NAS RA,
PhD, Researcher
livada0106@gmail.com

MAXIM SIMONYAN
H. Buniatyan Institute of Biochemistry NAS RA,
Professor
maxim.simonyan@gmail.com

DOI: 10.54503/2579-2903-2022.2-161

Abstract

O_2^--producing complexes or associates have recently been isolated from blood serum, goat milk, erythrocyte, leukocyte membranes, and medicinal plant membranes. Fe(III) ions in these complexes act as bridges for electron transfer from NADPH-containing lipoprotein (NCL) to molecular oxygen, reducing it up to O_2^-. On the other hand, NADPH oxidase (Nox) of erythrocytes and leukocytosis are activated by NCL in vitro. In fact, both serum and milk contain NCL.

The main systems for the production of O_2^- in mammalian milk and blood, as previously stated, are polymorphonuclear leukocytes, as well as O_2^--producing complex between NCL and Fe (III). At the same time, Fe(III) ions can be found in milk, and anemia can result from a Fe(III) deficiency in milk. The superoxide (O_2^-) - producing thermostable complex between NCL and Fe(III): NCL-Fe(III) was isolated and purified from raw and boiled cow milk, for the first time. The specific O_2^--producing activity of NCL-Fe(III) complex from milk, before and after boiling, practically does not change as a result of milk boiling (this activity decreases by only 7-8%).

After incubating an aqueous mixture of NCL (5 mg/ml) with an aqueous solution of Nox1 + Nox2 (erythrocytes or leukocytes membranes) isoforms, 5 mg/ml, at 37°C for 40 minutes, an ion exchange chromatography was performed on the column of DE cellulose, equilibrated by water at pH9.5. The hNCL-Nox associate eluates from this column with water at pH9.5

The specific O_2^--producing activity of hNCL-Nox isoforms of EM and LM basically does not decrease when compared to the NCL-Fe(III) complex. This is a promising finding, suggesting that milk NCL has stimulating the Nox from erythrocytes or leukocyte membranes in vitro does not decrease even after boiling.

In contrast to these O_2^--producing associates or complexes, NCL isolated from them, suppresses the oxidation of adrenaline to adrenochrome, exerting a reducing-antioxidant effect due to NADPH electrons in its composition (the Cu, Zn-SOD does not inhibit this process). The NCL isolated from this complex, at the expense of NADPH, has a reductive (antioxidant) influence and forms a hybrid O_2^--producing associate with isoforms of the NADPH oxidase from erythrocytes and leukocytes membranes.

Thus the properties of the thermostable complex NCL-Fe(III): O_2^--producing activity, as well as the reductive (antioxidant) activity of NCL, are practically preserved after milk boiling during 10-12 min.

Keywords and phrases:NCL, superoxide, thermostable complex.

NADPH ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻՆԻ ԵՎ FE(III)-Ի ՄԻՋԵՎ ՋԵՐՄԱԿԱՅՈՒՆ ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴ ԱՐՏԱԴՐՈՂ ՀԱՄԱԼԻՐ ԿՈՎԻ ԵՌԱՑՐԱԾ ԿԱԹԻՑ: ԻՄՈՒՆԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ IN VITRO NADPH ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎԱՑՈՒՄ NADPH ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻՆՈՎ

ՌՈՒԶԱՆՆԱ ՍԻՄՈՆՅԱՆ
Հ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտի
գիտաշխատող, լաբորատորիայի վարիչ,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
ruzan.simonyan@gmail.com

ԿԱՐԵՆ ՍԻՄՈՆՅԱՆ
Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
ավագ գիտաշխատող,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
karensimonyan86@gmail.com

ԳԵՂԱՄ ՍԻՄՈՆՅԱՆ
Հ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտի
գիտաշխատող,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
gegasim@mail.ru

ԳԱՅԱՆԵ ՄԱՐՄԱՐՅԱՆ
Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի
Կենսաքիմիայի ամբիոնի վարիչ,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
gmarmaryan@gmail.com

ԱՐՄԻՆԵ ԻՍՈՅԱՆ
Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
գիտաշխատող
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
isoyanarmin@gmail.com

ԼԻԼԻԹ ԴԱՐԲԻՆՅԱՆ
Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
գիտաշխատող
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
livada0106@gmail.com

ՄԱՔՍԻՄ ՍԻՄՈՆՅԱՆ
Հ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտի առաջատար
գիտաշխատող
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր
maxim.simonyan@gmail.com

Համառոտագիր

Արյան շիճուկից, այծի կաթից, էրիթրոցիտների և լեյկոցիտների թաղանթներից և դեղաբույսերի թաղանթներից մեկուսացվել են O_2^--արտադրող կոմպլեքսներ կամ ասոցիատներ:

Այս կոմպլեքսներում Fe(III) իոնները միջնորդներ են NADPH պարունակող լիպոպրոտեինից մոլեկուլային թթվածնին էլեկտրոնների փոխանցման գործընթացում՝ նվազեցնելով այն մինչև O_2: Մյուս կողմից, in vitro պայմաններում NADPH օքսիդազը (Nox) ակտիվանում է էրիթրոցիտների և լեյկոցիտների NADPH պարունակող լիպոպրոտեինով: Փաստորեն, և՛ շիճուկը, և՛ կաթը պարունակում են NADPH պարունակող լիպոպրոտեին: Կաթնասունների կաթում և արյան մեջ O_2-ի արտադրության հիմնական համակարգերը պոլիմորֆոնուկլեար լեյկոցիտներն են, ինչպես նաև NADPH պարունակող լիպոպրոտեինի և Fe-ի (III) միջև O_2-արտադրող համալիրը: Միևնույն ժամանակ, Fe (III) իոնները կարող են հայտնաբերվել կաթում և Fe (III) անբավարարությունից կարող է առաջանալ սակավարյունություն:

Կովի եռացրած կաթից առանձնացվել և մաքրվել է սուպերօքսիդի (O_2) կոլոիդային լուծույթ (ակտիվությունը նվազում է մինչև 7-8 %), որը NADPH պարունակող լիպոպրոտեինի և Fe (III)-ի միջև առաջացող համալիր է:

NADPH պարունակող լիպոպրոտեինի (5 մգ/մլ) ջրային խառնուրդի ինկուբացիայի արդյունքում Nox1 + Nox2 (էրիթրոցիտների և լեյկոցիտների թաղանթներից) իզոձևերի ջրային լուծույթով (5 մգ/մլ 37°C-ում, 40 րոպե), իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիան իրականացվել է ցելյուլոզային 52 DE-ով առանձին սյուների վրա և հավասարակշռվել է ջրով (pH9.5): NADPH պարունակող լիպոպրոտեին -Nox հիբրիդային միավորը չի մնում այս դիրքում և զտվում է ջրով՝ pH 9,5 պայմաններում:

Այդ համալիրը, ինչպես նաև լիպոպրոտեին ունեն բարձր ջերմակայունություն՝ գործնականորեն պահպանելով օպտիկական սպեկտրային պարամետրերը և ակտիվությունը ինկուբացիայից 10-15 րոպե հետո:

Ի տարբերություն այս O_2-արտադրող համալիրի՝ դրանցից առանձնացված NADPH պարունակող լիպոպրոտեինը ճնշում է ադրենալինի օքսիդացումը մինչև ադրենոքրոմ՝ իր բաղադրության մեջ պարունակվող NADPH էլեկտրոնների օքսիդավերականգնող ազդեցության պատճառով (Cu, Zn-SOD-ը չի արգելակում այս գործընթացը): Պարզվում է՝ այս համալիրից մեկուսացված լիպոպրոտեինը ունի վերականգնող (հակաօքսիդանտ) ազդեցություն և ձևավորում է հիբրիդային O_2-արտադրող և ջերմակայուն կապ NADPH օքսիդազի, էրիթրոցիտների և լեյկոցիտների թաղանթների իզոմերների հետ:

Այսպիսով՝ կաթը եռացնելուց 10-12 րոպե հետո գործնականորեն պահպանվում է ջերմակայուն լիպոպրոտեին-Fe (III) համալիրի O_2 արտադրող ակտիվությունը, ինչպես նաև լիպոպրոտեինի վերականգնող (հակաօքսիդանտ) ակտիվությունը:

Բանալի բառեր և բառակապակցություններ: NADPH պարունակող լիպոպրոտեին, սուպերօքսիդ, ջերմակայուն համալիր:

ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЙ СУПЕРОКСИД-ПРОДУЦИРУЮЩИЙ КОМПЛЕКС NADPH СОДЕРЖАЩЕГО ЛИПОПРОТЕИНА (НЛП) С Fe (III) ИЗ КИПЯЧЕННОГО МОЛОКА КОРОВЫ: IN VITRO АКТИВИРОВАНИЕ ЭТИМ НЛП ИЗОФОРМ NADPH ОКСИДАЗЫ ИММУННЫХ КЛЕТОК

РУЗАННА СИМОНЯН
Научный сотрудник, заведующая лабораторией
Институт биохимии им. Г. Буниатяна НАН РА, Ереван 0014, Армения
кандидат биологических наук
ruzan.simonyan@gmail.com

КАРЕН СИМОНЯН
Старший научный сотрудник
Институт физиологии им. Орбели НАН РА, Ереван 0028, Армения
кандидат биологических наук
karensimonyan86@gmail.com

ГЕГАМ СИМОНЯН
Научный сотрудник
Институт биохимии им. Г. Буниатяна НАН РА, Ереван 0014, Армения
кандидат биологических наук
gegasim@mail.ru

ГАЯНЕ МАРМАРЯН
заведующая кафедрой
Армянский национальный аграрный университет, Ереван, 0009, Армения
доктор биол. наук
gmarmaryan@gmail.com

АРМИНЕ ИСОЯН
Научный сотрудник
Институт физиологии им. Орбели НАН РА, Ереван 0028, Армения
кандидат биологических наук
isoyanarmin@gmail.com

ЛИЛИТ ДАРБИНЯН
Научный сотрудник
Институт физиологии им. Орбели НАН РА, Ереван 0028, Армения
кандидат биологических наук
livada0106@gmail.com

МАКСИМ СИМОНЯН
Профессор
Институт биохимии им. Г. Буниатяна НАН РА, Ереван 0014, Армения
доктор биол. наук
maxim.simonyan@gmail.com

Аннотация

O_2^--продуцирующие ассоциаты или комплексы были выделены из сыворотки крови, из молока коз, из эритроцитарных и лейкоцитарных мембран и из мембран лекарственных растений.

Как известно, основными системами продуцирования O_2^- в молоке и крови млекопитающих являются полиморфонуклеарные лейкоциты, а также O_2^--продуцирующий комплекс между NADPH содержащего липопротеина (НЛП) и Fe(III). При этом ионы Fe(III) присутствует и в молоке, а при дефиците Fe(III) в молоке наблюдается анемия. Из кипяченого молока коровы выделили и очистили колоидный раствор супероксид (O_2^-) – продуцирующего комплекса между NADPH содержащим липопротеином и Fe(III). Этот комплекс, а также НЛП имеют высокую термостабильность, практически сохраняя оптические спектральные показатели и активность после инкубации в течение 10-15 мин.

Удельная O_2^--продуцирующая активность комплекса НЛП-Fe(III) из молока до и после ее кипячения практически не изменяется, в результате кипячения молока эта активность снижается всего на 7-8 %.

Интересно и то обстоятельство, что удельная O_2^--продуцирующая активность гибридного ассоциата НЛП молока с изоформами Nox эритроцитарных и лейкоцитарных мембран также практически не снижается по сравнению с O_2^--продуцирующей активности комплекса НЛП-Fe(III). Это положительное явление, свидетельствующее об иммуномодулирующей активности НЛП молока, которая практически не снижается даже после кипячения молока.

В результате инкубации водной смеси НЛП (5 мг/мл) с водным раствором изоформ Nox1+Nox2 (эритроцитарных и лейкоцитарных мембран) по 5 мг/мл при 37°C в течение 40 мин осуществляли их ионообменную хроматографию на отдельных колонках с целлюлозой DE, уравновешенной водой при pH9,5. Гибридный ассоциат НЛП-Nox не задерживается на этой колонке и элюируется водой, а также при pH9,5.

В отличие от этих O_2^--продуцирующих ассоциатов или комплексов, отделенный от них НЛП, наоборот, за счет электронов NADPH в своем составе, подавляет окисление адреналина в адренохром, оказывая восстановительный – антиоксидантный эффект (Cu,Zn-СОД не влияет на этот процесс). Изолированный от этого комплекса НЛП оказывает восстановительный (антиоксидантный) эффект и образует гибридный O_2^--продуцирующий и термостабильный ассоциат с изоформами NADPH оксидазы (Nox) мембран эритроцитов и лейкоцитов.

Таким образом, после кипячения молокав течение 10-12 минут практически сохраняются O_2^--продуцирующая активность термостабильного комплекса НЛП-Fe(III), а также восстановительная (антиоксидантную) активность НЛП.

Ключевые слова и словосочетания: НЛП, супероксид, термостабильный ассоциат.

O_2^--producing complexes or associates have recently been isolated from blood serum, goat milk, erythrocyte and leukocyte membranes, and medicinal plant membranes. Fe(III) ions in these complexes act as bridges for electron transfer from NCL to molecular oxygen, reducing it up to O_2^-. On the other hand, NADPH oxidase (Nox) of erythrocytes and leukocytosis are activated by NCL in vitro. In fact, both serum and milk contain NCL [1-4]. The main systems for the production of O_2^- in mammalian milk and blood, as previously stated, are polymorphonuclear leukocytes, as well as O_2^--producing complex between NCL and Fe(III). At the same time, Fe(III) ions can be found in milk, and anemia can result from a Fe(III) deficiency in milk [5-7].

Using the elaborated and universal method for isolation and purification of above mentioned thermostable O_2^--producing associates and complexes from animal and plant-origin membranes and biofluids [8], is necessary from raw and boiled cow milk to isolated and purified thermostable O_2^--producing complex NCL-Fe(III), which can be generated O_2^- in homogeneous phase (in solution), as well as, in the gas phase.

The goal of this study: is to isolate and purify of thermostable O_2^--producing NCL-Fe (III) complex from raw and boiled cow milk to determine its composition, optical spectral parameters, the mechanism of O_2^- production by this complex, and hybrid associates with Nox from erythrocytes and leukocytes membranes in vitro; to determine the stationary concentration of produced O_2^- in solution and gas phase.

Material and methods

Isolation and purification of the O_2^--producing NCL-Fe (III) complex from cow milk

The O_2^--producing NCL-Fe(III) complex was isolated and purified from raw and boiled cow milk using a universal method, that included precipitation of the complex at pH4.8 and dissolving the precipitate at pH9.5. This complex's aqueous opalescence solution was subjected to ion exchange chromatography at pH9.5 on the DE-52 cellulose column. The O_2^--producing complex does not remain within the column and is free evaluated. Under these conditions, the acidic proteins were adsorbed on this column. This fraction of the NCL-Fe(III) then underwent gel-filtration on the Sephadex G-100 column (Pharmacia, Sweden) at pH9.5.Theeluated fractions with symmetrical elution diagrams were collected.

Determination of the Fe(III) in the composition of NCL-Nox

Using the ortophenantroline optical spectral method [9], the content of Fe(III) in this complex was determined, after separation of the Fe(III) by 50 mkM EDTA and reduction of Fe(III) to Fe(II) by sodium dithionite.

Isolation and purification of the total fraction of Nox1 + Nox2 isoforms from erythrocyte (EM) and leukocyte membranes (LM)

The pH of aqueous mixtures of EM and LM was adjusted to 9.5 by adding 0.1 M KOH and 50 μM ferric hemoglobin (Hb), isolated from human erythrocytes, and incubated at 37°C for 1.5 hours. After centrifugation at 5800 xg for 10 min, supernatants were subjected to ion exchange chromatography on the column with DE-52 cellulose. After elution of the Hb fraction with 0.005 M potassium phosphate buffer, pH7,4 (PPB), the total fraction of Nox1 + Nox2 isoforms of EM or LM was eluted by 0.2 M PPB from these columns. Following gel filtration of the total fraction of Nox1+Nox2 isoforms on a Sephadex G-100 column, traces of Hb in the complex with Nox were removed using an ethanol-chloroform solution (9:1 ml/ml, for 10 ml of solution).

Isolation of NCL from NCL-Fe(III) complex

EDTA ($2x10^{-4}$ M) was used to remove Fe(III) from this complex, followed by ion-exchange chromatography on DE-52 cellulose at pH9.5. Under these conditions, EDTA with Fe(III) is absorbed on this column, and NCL is eluted quickly.

The preparation of hybrid NCL-Nox associate (h NCL-Nox) between NCL from NCL-Fe(III) complex and total fraction of Nox1 + Nox2 isoforms from EM and LM

After incubating an aqueous mixture of NCL (5 mg/ml) with an aqueous solution of Nox1 + Nox2 (EM) or (LM) isoforms, 5 mg/ml, at 37°C for 40 minutes, an ion exchange chromatography was performed on the column of DE cellulose, equilibrated by water at pH9.5. The hNCL-Nox associate eluates from this column with water at pH9.5

Determination of NADPH

The presence of NADPH in the complex of NCL-Fe(III), hybrid associate hNCL-Nox, or NCL was determined using a spectrofluorimetric method on a «Perkin Elmer» spectrofluorimeter (USA). NADPH has an emission peak at 430 nm and an excitation peak at 370 nm [10]. It was determined the fluorescence intensity «F» in relative units.

Determination of O_2^--producing activity of the complex of NCL-Fe(III) and hybrid associates

The adrenaline method was used to determine the O_2^--producing activity of the complex of NCL-Fe(III) and hybrid associates hNCL-Nox, as well as the reductive (antioxidant) effect of NCL [11]. As a unit of the O_2^--producing activity is 50% stimulation of the formation of adrenochrome (at 500 nm) during oxidation of adrenaline by superoxide radicals, was produced by 1 mg NCL-Fe(III) complex or associate: U/mg.

Determination of the stationary concentration of produced O_2^-

The stationary concentration of O_2^-, produced by a complex of the NCL-Fe(III) or hybrid associate: hNCL -Nox was determined by the adrenaline method also, determining the maximal optical absorbance of adrenochrome (at 500 nm), was formed during oxidation of adrenaline with produced O_2^- [11].

At the same time, the stationary concentration (M) of produced O_2^- is equivalent to the concentration of formed adrenochrome, with the molar extinction (E) to 750 $M^{-1}см^{-1}$. By determining the value of A_{500}/E, the stationary concentration (M) of O_2^-, produced by these sources in the solution was determined. As a control, the optical absorbance of adrenochrome formed during the oxidation of adrenaline by the air oxygen was used. The stationary concentration of gas phase O_2^-, was generated during bleeding by O_2 (0,1atm, at room temperature, during 5 min) of the solution of NCL-Fe(III) and transferring of the O_2^-- O_2 mixture by glass or silicone tube to the adrenaline solution.

The malondialdehyde (MDA) product of lipid peroxidation in NCL was determined using the Vladimirov and Archakov method [12].

The electrophoresis of NCP-Fe(III) was carried out on the 7% PAAG for the proteins with acidic and basic character.

Cellulose DE-52 ("Whatman", England) and Sephadex G-100 ("Pharmacia", Sweden) were used. During the investigation, the spectrophotometer “Cary 60” UV/VIS, spectrofluorimeter "Perkin Elmer” (USA), centrifuge K-24 and K-70 (“Janetzki”, Garmany) were used.

The statistical processing of the obtained results was carried out by the Student-Fisher variation statistics method, with the determination of the reliability criterion «p» (M ± m, n = 6).

Results and discussion

Using the universal method, from raw and boiled (10-15 min) cow milk was isolated and purified the O_2^--producing complex NCL-Fe(III) for the first time. The aqueous opalescence solution of the NCL-Fe(III) complex is not adsorbed on DE-52 cellulose at pH9.5. After the concentration of this fraction, the gel filtration on the Sephadex G-100 at pH 9,5 was carried out. The fractions evaluated with a symmetric elution diagram were collected.

In PAAG electrophoresis for the acidic and basic character proteins, the O_2^--producing complex NCL-Fe(III) from cow's milk was aggregated on the exit of the PAAG-containing tubules. It is possible, that under the influence of the electricity the aggregation of the NCL-Nox on heterogeneous phase (on PAAG) was carried out. The presence on the PAAG of acidic and basic character proteins, which are colored by amido black, was not detected. This is the first indirect factor of the purity of the NCL-Fe(III). The second factor of the purity is a symmetrical evaluation diagram from G-100 Sephadex and the third factor is invariable of the relation A_{412}/A_{280} during further purification of NCL-Fe(III).

The presence of MDA in NCL from raw and boiled milk is up to $2{,}4 \times 10^{-5}$ M/mg and $2{,}1 \times 10^{-5}$ M /mg, respectively.

The specific content of NCL-Fe(III) in raw and boiled milk, determined after desalting and vacuum lyophilization is 17.1 ± 0.12 mg/ml and 16.7 ± 0.11 mg/ml of milk ($p < 0.05$), respectively. The content of the Fe(III) in the composition of the NCL-Fe(III) from raw and boiled milk were 2,4 mkM/ml ± 0,01 and 2,1 mkM/ml ± 0,03 ($p<0{,}005$, n=6), correspondingly.

The form of optical absorption spectra of the opalescence solution of NCL-Fe(III) complex from raw and boiled milk and NCL are not changed in the visible UW region of the spectra (Fig. 1).

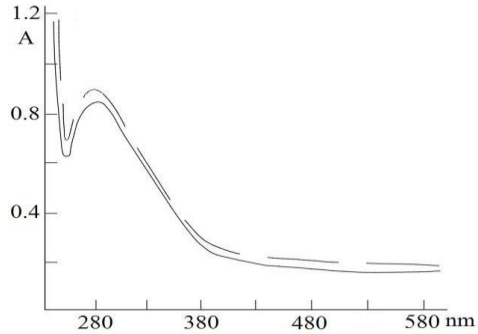

Fig. 1. Optical absorption spectra of opalescence solution of NCL-Fe (III) complex from milk or NCL before (-----) and after milk boiling (___) at pH 9.5.

There is a protein-specific optical absorption at 280 nm in the UV region. The forms of optical absorption spectra and the intensity of the optical absorption of NCL do not change after Fe(III) removal. As shown in Fig. 2, there is characteristic background absorption of the isoforms of a hybrid associate of NCL between Nox from erythrocyte or leukocyte membranes (hNCL-Nox).

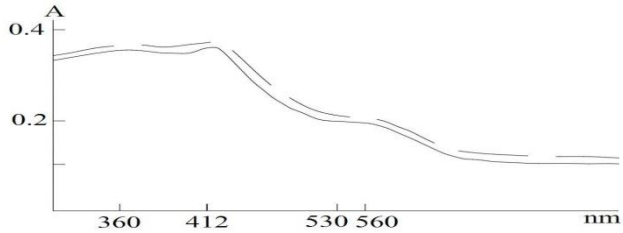

Fig. 2. Optical absorption spectra in the visible region of opalescence solutions (at pH9.5) of O_2^--producing hybrid associate between Nox from EM or LM and NCL from cow milk complex NCL-Fe(III) (raw (---) and boiled (___) milk).

In Fig.2 there are characteristic optical absorbances for the Nox in hybrid associates in the oxidized state (360 nm, 412 nm, 530, and 560 nm). In the UW region, the characteristic spectra for the protein optical absorption at 280 nm were indicated for the isoforms of hNCL-Nox (EM) and hNCL-Nox (LM).

Furthermore, ion-exchange chromatography and gel filtration do not decay the complex of NLC-Fe(III) and hybrid associates.

The higher thermostability of the O_2^--producing complex NCL-Fe(III) from cow milk and hNCL-Noxcan be connected with the increase in the temperatures to 280-300°C, during nanosecond, for transmission of oxidation/reduction metabolic process [13].

The fluorescence intensity «F»(in relative units) of the NADPH in the composition of the complex NCL-F(III) for the raw and boiled cow milk was practically similarly: 45,5±2,2 and 44,3±0,7 ($p>0,005$, n=6), correspondingly.

The immediate mechanism of O_2^- production by the complex of NCL-Fe(III) was conditioned with the transfer of electrons from NCL to Fe(III), then to O_2, reducing it up to O_2^-. The immediate mechanism of O_2^-production by hNCL-Nox associate was conditioned with transfer of the electron from NCL to the Fe(III) of the heme group of Nox, then to O_2, reducing it up to O_2^-. The Cu, Zn-SOD completely inhibits adrenaline oxidation by the produced O_2^-.

The specific O_2^--producing activity of NCL-Fe(III) complex from milk, before and after boiling, practically does not change as a result of milk boiling (this activity decreases by only 7-8%). The specific O_2^--producing activity of hNCL-Nox isoforms of EM and LM basically does not decrease when compared to the NCL-Fe(III) complex. This is a promising finding, suggesting that milk NCL has stimulating the Nox from erythrocytes or leukocyte membranes in vitro does not decrease even after boiling. In contrast to these O_2^--producing associates or complexes, NCL isolated from them, suppresses the oxidation of adrenaline to adrenochrome, exerting a reducing-antioxidant effect due to NADPH electrons in its composition (the Cu, Zn-SOD does not inhibit this process).

The stationary concentration of gas phase O_2^-, generated from complex NCL-Fe(III) from raw and boiled cow milk were: 1,6 ± 0,04 mkM and 1,4±0,1 mkM ($p>0,005$, n=6) by 1mg complex, during 1 min at room temperature (the catalytically amount Cu,Zn-SOD inhibited also the formation of gas phase O_2^-).

In fact, oxygen can stabilize the gas phase O_2^- by forming the coordination band between O_2 and O_2^-. On the other hand, it is known, that the gas phase O_2^- is formed in the air, by reducing the molecular oxygen by negative metal ions traces; during reduction of oxygen by the electrochemical way; within plant photosynthesis, called “gas-phase superoxide generator” [14-16].

The generated monocomponent and regulated stationary concentration of gas phase O_2^- by enzymatic way from cow milk NCL-Fe(III), can be used with the oxygen mask at the lung infection diseases in experiments, as well, in perspective, in clinics, also. In comparison with the other gas phase O_2^-, the monocomponent and regulated stationary concentration of produced O_2^-continuously and enzymatically by milk NCL-Fe(III) complex is preferential. The fundamental significance of the obtained results: 1) the immediate mechanism of the production of $O_2^-$by complex of NCL-Fe(III) from milk and hNCL-Nox. By this mechanism as an electron bridge it was used the connected NADPH in the composition of NCL, but not free NADPH; 2)the formation of the monocomponent and regulating the stationary concentration of gas phase O_2^- from solutions of this complex of NCL-Fe(III) or hNCL-Nox associate; 3) the stabilization of the gas phase superoxide radicals by molecular oxygen.

The practical significance of obtained results, in particular, the qualitative and quantitative changes of NCL-(FeIII) complex as new sensitive tests for evaluation of the quality of the milk; the use of the gas phase O_2^- as a antimicrobial and anticancer agent; as a stimulator of the proliferation of bone marrow stem cells in culture, etc.

In fact, NCL can be a component of milk immunomodulation and can have a positive effect on immunodeficiency [17], by stimulating the O_2^--producing activity of Nox isoforms of immune cell membranes. However, for this conclusion, it is necessary that similar investigations in experiments, after feeding of the NCLto the animals will be carried out. On the other hand, the O_2^--producing complex and hybrid associates can be used as natural, potential bactericidal and antiviral agents, particularly at high temperatures.

Conclusion

Thus after boiling cow milk, the physicochemical properties of O_2^--producing complex NCL-Fe (III) practically remain unchanged.

References

1. Isoyan A. S. Simonyan K. V, Simonyan R. M, Babayan M. A, SimonyanG.M, Chavushyанн V.A and Simonyan M.A (2019) Superoxide-producing lipoprotein fraction from Stevia leaves Definition of Specific Activity. BMC Complementary and Alternative Medicine 19**,** 88-94.DOI: 10.1186/s12906-019-2500-1.
2. Simonyan R.M., Chailyan S.G., Chavushyan, Simonyan K.V., Isoyan A.S., Babayan M.A., Simonyan G.M., Simonyan M.A. (2020) Superoxide-producing associate between NADPH oxidase and NADPH containing lipoprotein (NCL) from human blood erythrocytes and leukocytes membranes: activation of immune cells by NCL. Biol. Journal of Armenia, 4(72):47-54.
3. Simonyan M.A, Karapetyan A.V, Babayan M.A and Simonyan R.M. (1996) NADPH-containing Superoxide-Producing Lipoprotein Fraction of Blood Serum. Isolation, Purification, Brief Characterization, and Mechanism of Action. Biochemistry (Moskow) 61, 671-675.PMID: 8754277.
4. Симонян М.А., Карапетян А.В., Галстян Д.А., Симонян Р.М., Бабаян М.А. (1996) Супероксид-продуцирующий липопротеин как фактор подавления роста опухолей,повышения числа лейкоцитов, ускорения деления клеток в культуре.//Биохимия,61(9):1578-1583.

5. Gayane Marmaryan, Maxim Simonyan, Hasmik Grigoryan, Ruzan Simonyan. Content of superoxide-Producing Associate of Saanen and Local Goats Milk.(2020) Advanced research in life sciences. 4, 2020, 54-57.
6. Maiara G.Blagitz, Fernando N.Souza,VivianiGomes,Alice M.M., P.Della Libera (2011) Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. Small Ruminant Research,,100 (1): 67-71.
7. Chiang C.C., Chang C.J., Peh.Shuen-Ei Chen H.C.(2009) Calcium homeostasis and its relationship to superoxide production in blood and milk neutrophils oflactating goats. Veterinary Immunology and Immunopathology, 133(2-4):125-132.
8. Diaz-Castro J., Pulido M., Alfered M.J M., Ochoa J., Rivas E., HijanoS.,.Lopez-AliagaJ (2014) Goat milk consumption modulates liver divalent metal transporter 1 (DMT1) expression and serum hepcidin during Fe repletion in Fe-deficiency anemia. Dairy Sci.,97:147–154.
9. Simonyan R.M., Simonyan M.A. (2021), Method of the preparation of superoxide producing thermostable systems from biomembranes and biofluids. The license of Invention AM 20210030,Yerevan, Armenia 2021.
10. Umesh C. Gupta (1968)Phenanthroline method for determining iron in plant materials. *PlantandSoil*, 28:298–305.
11. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М.(1996) NADPH-содержащая супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови, выделение, очистка, краткие характеристики и механизм действия.Биохимия, 61(5):932-938.
12. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J.Biol.Chem., 1972, 247(10): 3170-3175.
13. Vladimirov Yu.A., Archacov A.I. Lipid peroxidation in biomembranes. Nauka, 1972, Moscow.
14. Bradley C. Steel, David R. McKenzie, Marcela M. M. Bilek, Neil J. Nosworthy, Cristobal G. dos Remedios. Nanosecond Responses of Proteins to Ultra-High Temperature Pulses. Biophys J. 2006. 91(6): L66–L68.
15. Naum I. Goldstein, Roman N. Goldstein & Mark N. Merzlyak. Negative air ions as a source of superoxide. *International Journal of Biometeorology* 1992, 36:118–122.
16. V.A.Tails, Yu.M.Zhukovsky, V.G. Panov, K.V. Olshevskiy. The use of gas phase superoxide inhalation in elite athletes' training. Teoriva.ru. «J.Theory and practice of physical culture», http://www.trfk.ru/. panowic @vandex.ru. Victor Panov.V.V.
17. Chen T.P., Roberts R.L., Wu K.G., Ank B.J., Stiehm E.R. Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults. Pediatr Res. 1993 34(4):544-50.