



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

АКТИВНОСТЬ, СТЕПЕНЬ ОТЦЕПЛЕНИЯ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ФЕРРИГЕМОГЛОБИНОМ ИЗОФОРМ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН И ЭКЗОСОМ СЫВОРОТКИ ПАЦИЕНТОВ- НОСИТЕЛЕЙ РАКА ЖЕЛУДКА

Р.М. СИМОНЯН¹, С.В. ШИРИНЯН², М.А. БАБАЯН¹, А.С. АЛЕКСАНИЯН³,
Г.М. СИМОНЯН¹, А.Ф. ГРИГОРЯН³, С.С. АЛЕКСАНИЯН³, М.А. СИМОНЯН¹

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана

²Областной онкологический диспансер г. Гюмри

³Педагогический институт им. М. Налбандяна г. Гюмри

Maxim.simonyan@gmail.com

Впервые показано, что по сравнению с показателями донорской крови при раке желудка человека (срок давности 3-4 г) наблюдается уменьшение ($14,3 \pm 2,2$ %, $p < 0,05$, $n=6$) рилизинга NADPH оксидазы (Nox) из мембран эритроцитов (ЭМ), а также стимуляция ($17,4 \pm 2,5$ %, $p < 0,05$, $n=6$) рилизинга eNox из экзосом сыворотки крови. Одновременно в аналогичной динамике наблюдается изменение уровня комплексообразования Nox с ферритгемоглобином. Притом на фоне повышения NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей активности наблюдается снижение ферриHb-восстанавливающей активности этих ферментов. Таким образом, нарушение окислительно-восстановительного статуса ЭМ и экзосом при раке желудка человека может быть обусловлено вышеуказанными изменениями.

Рак желудка человека – эритроциты – сыворотка – NADPH оксидаза-рилизинг

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ դոնորական արյան ցուցանիշների համեմատ ստամոքսի քաղցկեղով (3-4 տարի վաղեմությամբ) հիվանդ մարդկանց էրիթրոցիտների թաղանթների (ԷԹ) անկայունացումը առնչվում է այդ թաղանթներից ՆԱԴՔԻ օքսիդազի (Nox) արտազատման (ռիլիզինգ) ընկճման ($14,3 \pm 2,2$ %, $p < 0,05$, $n=6$) և արյան շիճուկի էկզոսոմներից eNox-ի ռիլիզինգի խթանման ($17,4 \pm 2,5$ %, $p < 0,05$, $n=6$) հետ: Դիտվում է նաև Nox-երի և ֆերրիհեմոգլոբինի միջև կոմպլեքսագոյացման մակարդակի նմանատիպ դիսամիկայով փոփոխում: Դրա հետ մեկտեղ, այդ Nox-երի ՆԱԴՔԻ կախյալ O_2^- -ի գոյացման ակտիվության աճին զուգընթաց տեղի ունի դրանց՝ ֆերրիհեմոգլոբինի վերականգնման ակտիվության ընկճում: Այսպիսով, այս փոփոխություններով կարող են պայմանավորված լինել ԷԹ-երի և էկզոսոմների օքսիդա-վերականգնման կարգավիճակի խախտումները մարդու ստամոքսի քաղցկեղի ժամանակ:

Մարդու ստամոքսի քաղցկեղ - էրիթրոցիտներ - շիճուկ - ՆԱԴՔԻ օքսիդազ - ռիլիզինգ

For the first time, in comparison with the indices of donor blood, in the blood of the patients of stomach malignant tumor (duration of disease 3-4 years) the

decrease ($14,3 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$, $n=6$) of the releasing of the NADPH oxidase (Nox) from membrane of erythrocyte (EM) and the increase ($17,4 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$, $n=6$) of the releasing of the Nox from serum exosomes was observed. Simultaneously, the identical change of the dynamics of the level of complex between the Nox and ferrihemoglobin take place. Moreover, on the background of the increase of the NADPH depended O_2^- produced activity and the decrease of the ferrihemoglobin-reduced activity of this enzyme was observed. Thus, these changes can be conditioned the breach of the oxidation-reduction status of EM and exosomes at the human stomach malignant tumor.

Human stomach malignant tumor – erythrocytes – serum – NADPH oxidase - releasing

Изоформы NADPH оксидазы (Nox) играют ключевую роль для пролиферации и развития нормальных и опухолевых клеток [8]. При злокачественных новообразованиях желудка человека наблюдается повышенная экспрессия Nox1 как фактора регуляции клеточной иммунной системы [10, 12]. Изоформы Nox локализованы не только в клеточных формированиях [1, 14], но и в экзосомах, локализованных в сыворотке крови и в биожидкостях различного характера, например, в сыворотке крови и жидкостях асцитных карцином [2, 3, 11]. За счет продуцируемых супероксидов экзосомы стимулируют внеклеточную иммунную систему и при канцерогенезе [6, 7, 15]. В свою очередь при канцерогенезе наблюдается существенное снижение стабильности эритроцитарных мембран (ЭМ), некоторый выброс гемоглобина в сыворотку крови и соответственное изменение уровня и активности изоформы Nox ЭМ [11].

Целью работы являлось определение характерных изменений оптических спектральных показателей, а также NADPH-зависимой супероксид(O_2^-)-продуцирующей и ферригемоглобин(ферриHb)-восстанавливающей активности изоформ Nox из ЭМ и экзосом сыворотки крови пациентов с раком желудка по сравнению с показателями донорской крови.

Материал и методика.

С целью представления полученных нами данных для включения в историю болезни проанализирована венозная кровь (по 5 мл) 6-ти пациентов с раком желудка (РЖ) с давностью заболевания 3-4 года из онкологического диспансера г.Гюмри. Для выделения и очистки Nox из ЭМ и экзосом сыворотки донорской крови и крови пациентов носителей РЖ использовали целлюлозу DE-52 («Whatman», Англия) и сефадекс DEAE A-50 («Pharmacia», Швеция). Для определения O_2^- -продуцирующей активности Nox были использованы нитротетразолиевый синий (НТС), феназинметасульфат (ФМС), пирофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH («Sigma», США). Для восстановления Nox использовали кристаллы дитионита натрия («Sigma», США). Для оценки ферриHb-восстанавливающей активности Nox, а также для комплексообразования гемоглобина с изоформами Nox был использован электрофоретически гомогенный ферриHb, выделенный из цитозоля эритроцитов донорской крови. При ионообменной хроматографии и гель-фильтрации были использованы стеклянные колонки с фильтрами размером 2×10 см и 3×80 см соответственно, а также центрифуги K-24 и K-70 («Veb MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf», Германия) и ультратермостат (Германия). Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Hitachi 2000 (Япония) в кюветках с длиной оптического пути 1 см. Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с использованием метода вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности "p".

Выделение и очистка Nox из эритроцитарных мембран. Эритроцитарные мембраны (5 мл эритроцитов) промывали сначала 0,04 М калий фосфатным буфером (КФБ, 1:200 об/об), затем водой (1:500 об/об) и после центрифугирования в течение 10 мин при

10.000×g, осадок ЭМ гомогенизировали в воде (1:20 об/об). После инкубации смеси ЭМ с 5 мМ ферриНб при pH 7,4 в течение 2 ч и центрифугирования супернатант разбавляли водой (в 30 раз) и подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52, из которой ферриНб элюировали 0,004 М, а Nox - 0,1 М КФБ [1].

Выделение и очистка экстрацеллюлярной Nox из экзосом сыворотки крови. После осаждения эритроцитов центрифугированием крови при 6000×g, 10 мин сыворотку отделяли и инкубировали с 5 мМ ферриНб в аналогичных условиях. После тридцатикратного разбавления водой инкубационного раствора его подвергали ионообменной хроматографии на сефадексе DEAE A-50, уравновешенном 0,001 М КФБ. Из этой колонки ферриНб элюировали 0,004 М, а экстрацеллюлярную Nox (eNox) 0,03 М КФБ. После разбавления элюата водой (в 20 раз) eNox подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52, уравновешенной 0,001 М КФБ. Из этой колонки eNox была элюирована также 0,03 М КФБ [1].

Определение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox. NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли с помощью НТС путем вычисления процента оптической плотности, образующегося в результате восстановления НТС супероксидными радикалами формазана при 560 нм. За единицу NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности Nox принимали количество белка (плотность оптического поглощения β -полосы при 530 нм), стимулирующего образование формазана на 50%. Удельную NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность Nox определяли в расчете на 1 г ткани или 1 мл сыворотки и 1 мл цитозоля [4].

Определение ферриНб-восстанавливающей активности изоформ Nox. ФерриНб-восстанавливающую активность изоформ Nox выявляли кинетическим методом путем определения снижения плотности оптического поглощения α -полосы ферриНб под влиянием Nox. За единицу ферриНб-восстанавливающей активности Nox принимали количество белка, вызывающее снижение плотности максимального оптического поглощения α -полосы ферриНб до 0,05 оптических единиц в течение 30 мин при 37°C. Удельную ферриНб-восстанавливающую активность изоформ NADPH оксидаз определяли в расчете на 1 г ткани, 1 мл сыворотки и 1 мл цитозоля [4].

Результаты и обсуждение.

Для выделения изоформ Nox из ЭМ и экзосом сыворотки донорской крови и крови пациентов с РЖ было использовано открытое недавно явление комплексообразования ферриНб с изоформами Nox [5]. Фактически ферриНб, связываясь с локализованной на поверхности ЭМ или мембран наночастиц (экзосом), Nox переводит последнюю из гетерогенной в гомогенную (растворимую) фазу. При этом ассоциированный с Nox ферриНб отделяется от Nox ионообменной хроматографией на целлюлозе DE-52 (для Nox из ЭМ) и DEAE A-50 (для eNox из экзосом сыворотки). Форма и максимумы оптических поглощений Nox и eNox крови пациентов с РЖ практически не отличаются от таковых донорской крови: в окисленном состоянии имеются характерные для Nox (цитохрома b_{558}) максимальные оптические поглощения при 560 нм, 530 нм и 412 нм, а в восстановленном дитионитом натрия состоянии – при 558 нм, 540 нм и 418 нм. Для eNox имеется характерное поглощение при 485 нм. Однако степень отщепления (рилизинг) Nox из ЭМ при РЖ ниже таковой у Nox из ЭМ донорской крови ($14,3 \pm 2,2$ %, $p < 0,05$) (рис.1а). Возможно, это связано с повышением липидной пероксидации этих мембран и изменением их текучести [13,9]. Наоборот, степень отщепления eNox из экзосом сыворотки крови больных с РЖ увеличена на $17,4 \pm 2,5$ %, $p < 0,05$) (рис.1б). По сравнению с сывороткой донорской крови в сыворотке крови пациентов с РЖ имеются следы ферриНб ($A_{565} = 0,23$) из-за ослабления ЭМ, частичного гемолиза эритроцитов и выхода гемоглобина в сыворотку. Этот гемоглобин может инициировать выход eNox из экзосом в растворимую фазу [5]. В результате комплексообразования с изоформами Nox

наблюдается изменение изоэлектрической точки ферриHb и последний осаждается вместе с Nox на целлюлозе DE-52 или DEAE A-50 (ферригемоглобин является гемопотеином основного характера и в нативном состоянии осаждается только на целлюлозе CM-52). В данном случае уровень комплекса ферриHb с Nox прямо пропорционален уровню Nox или eNox (рис.2 а,б). По сравнению с показателями донорской крови NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox и eNox повышена на $22,6 \pm 3,3$ % и $31,3 \pm 4,2$ % ($p < 0,05$, $n=6$) соответственно. Однако, по сравнению с показателями донорской крови, ферриHb-восстанавливающая активность Nox и eNox при РЖ снижена на $12,6 \pm 1,1$ % и $18,1 \pm 2,4$ % ($p < 0,05$, $n=6$) соответственно.

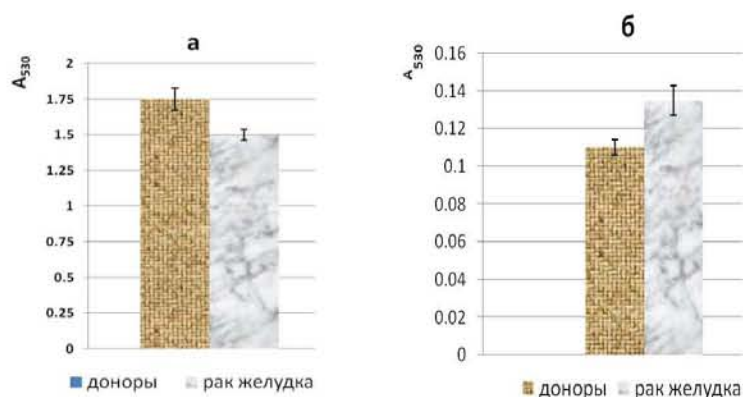


Рис.1. а - Расчетное удельное содержание Nox (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм 1 мл Nox, полученной из 1 мл эритроцитов), отщепленной из ЭМ донорской крови и ЭМ крови пациентов, носителей рака желудка ($p < 0,05$, $n=6$). б - Расчетное удельное содержание eNox (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм 1 мл eNox, полученной из 1 мл сыворотки крови), отщепленной из экзосом сыворотки донорской крови и экзосом сыворотки крови пациентов, носителей рака желудка ($p < 0,05$, $n=6$).

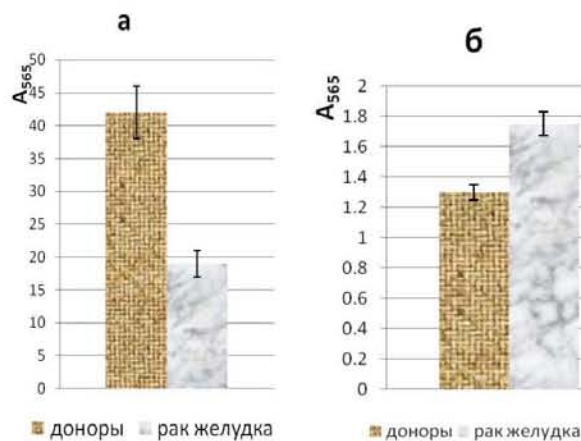


Рис.2. а - Расчетное удельное содержание ферритина, полученного из комплексного соединения ферритина с Nox ЭМ (плотность максимального оптического поглощения при 565 нм 1 мл ферритина, полученного из 1 мл эритроцитов), выделенного из эритроцитов донорской крови и эритроцитов крови пациентов, носителей рака желудка ($p < 0,05$, $n=6$). б - Расчетное удельное содержание ферритина полученного из комплексного соединения между eNox из экзосом сыворотки донорской крови и экзосом сыворотки крови пациентов, носителей рака желудка ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким образом, при раке желудка человека дестабилизация ЭМ ассоциирована с уменьшением релизинга Nox из ЭМ. При этом наблюдается стимуляция отщепления eNox из экзосом сыворотки крови на фоне повышения O_2^- -продуцирующей и снижения ферриHb-восстанавливающей активности этих ферментов. Как результат таких изменений происходит снижение кислородного гомеостаза и нарушения окислительно-восстановительного статуса ЭМ и экзосом.

*Работа осуществлена при финансовой поддержке
гранта государственного комитета по науке
Республики Армения 13-1F 279.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Միմոնյան Ռ.Մ., Միմոնյան Գ.Մ., Միմոնյան Մ.Ա. Կենսաաժամկարգերից ՆԱԴՓН-օքսիդազի (Nox) իզոմերի արտազատման եղանակ: ՀՀ Մտավոր սեփականության գործակալություն, գյուտի արտոնագիր N2818 A, 2014 թ.
2. Алексанян М.К., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Алексанян С.С., Симонян М.А. Экстрацеллюлярная NADPH оксидаза из асцитной карциномы Эрлиха и дисбаланс между прооксидантными и антиоксидантными металлопротеинами клеток тканей мышей. Медицинская наука Армении НАН РА., LI, 4. с. 46-57. 2011.
3. Алексанян М.К., Симонян Г.М., Алексанян Серг. С., Симонян Р.М., Ширинян В.А., Алексанян С.С., Симонян М.А. Повышение уровня экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в асцитной карциномы легких человека. Вопросы теоретической и клинической медицины. 15, 1 (68), с. 10-12, 2012.
4. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А., Секоян Э.С. Влияние низкоспинового гелий-неонового лазера на супероксид-продуцирующую и метHb-восстанавливающую активность цитохрома b_{558} эритроцитарных мембран. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 4, с. 9-11, 2007.
5. Симонян Р.М., Галоян К.А., Симонян Г.М., Хачатрян А.Р., Бабаян М.А., Оксюзян Г.Р., Симонян М.А. Ферригемоглобин индуцирует релизинг NADPH оксидазы из клеток мозговой ткани *ex vivo*: подавления этого процесса галармином. Нейрохимия, 30(3), с.1-5, 2013.
6. Admyre C., Johansson S.M., Qazi K.R., Filen J.-J., Lahesmaa R., Norman M., Neve EPA, Scheynius A., Gabrielsson S. Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J Immunol.* , 179, p.1969-1978. 2007.
7. Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* , 17, p. 879-887, 2005.
8. Oberley L.W., Buettner G.R. Role of SOD in cancer. *Cancer Res.*, 39, p.1141-1149. 1979.
9. Ribarov S.R., Benov L.C., Marcova V.I. Possible contribution of oxyhemoglobin to the iron-induced hemolysis simultaneous effect of iron and hemoglobin on lipid peroxidation. *Blut. Apr*; 46(4), p.5
10. Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y., Tominaga K., Sekiyama A., Teshima-Kondo S. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.*, 8(9-10), p1573-1582. 2006.
11. Simonyan R.M., Simonyan G.M., Oxuzyan G.R., Alexanyan S.S., Simonyan M.A. The hemoglobin induces releasing of the extracellular NADPH oxidase in mammalian blood serum and fluids of ascitic carcinomas *in vitro* and *in vivo* . Issues in theoretical and clinical medicine, 17(2), p.16-21, 2014.

12. *Tominaga K., Kawahara T., Sano T., Toida K., Kuwano Y., Sasaki H., Kawai T., Teshima-Kondo S., Rokutan K.* Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic Biol Med.*, 43(12), p.1627-38. 2007.
13. *Trotta R.J., Sullivan S.G., Stern A.* Lipid Peroxidation and Haemoglobin Degradation in Red Blood Cells, Exposed to t-butyl Hydroperoxide. *Biochem.J.*, 204, p. 405-415. 1982
14. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (9), p.1428-1459. 2002.
15. *Wolfers J., Lozier A., Raposo G., Regnault A., Théry C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.*, 7, p.297-303, 2001.