



Биолог. журн. Армении, 1 (68), 2016

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ФРАКЦИИ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ ИКРЫ РУЧЬЕВОЙ ФОРЕЛИ, КОРОВЬЕГО МОЛОКА И КУРИНОГО ЖЕЛТКА

¹Р.М. СИМОНЯН, ²С.М.ФЕСЧЯН, ¹Г.М.СИМОНЯН,
³Г.Р.ОКСУЗЯН, ¹М.А СИМОНЯН

¹Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана, НАН РА

²Государственный медицинский университет им. М.Гераци

³Государственный педагогический институт им. М.Налбандяна г.Гюмри
maxim.simonyan@gmail.com

Впервые с использованием явления нестабильного комплексообразования между гемоглобином и NADPH оксидазой, (Nox) локализованной в мембранных формированиях икры ручьевой форели, желтка куриных яиц и экзосом коровьего молока, выделены фракции изоформ Nox, расчетное удельное оптическое поглощение которых при 530 нм составляет 0,35, 0,15 и 0,24 оптических единиц (ое) соответственно. Изоформы Nox, выделенные из желтка, молока и икры, имеют повышенное содержание малонового диальдегида (фосфолипидных остатков): 10,8±1,3; 12,3±2,0 и 14,6±2,1 мМ/мг Nox, $p<0,05$, $n=6$ соответственно. Представленные Nox имеют характерные оптические спектры поглощения. Наблюдается прямо пропорциональная зависимость между содержанием фосфолипидных остатков и удельной NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активностью этих Nox. По сравнению с удельной O_2^- -продуцирующей активностью Nox из клеточных мембран млекопитающих, эта активность у Nox из икры, молока и желтка повышена в 3-4 раза. Эти биохимические показатели могут быть использованы для оценки качества пищевых продуктов, а также как новые и чувствительные диагностические тесты при заболеваниях дойных коров, рыб и кур.

NADPH оксидаза – молоко – яичный желток – икра рыбы

Առաջին անգամ օգտագործելով հեմոգլոբինի, լճակային Ֆորելի ձկնկիթի և հավի դեղնուցի թաղանթային կազմավորումներում և կաթի էկզոսոմներում տեղակայված ՆԱԴՔԻH օքսիդազի (Nox) հետ անկայուն կոմպլեքսագոյացման երևույթը անջատվել են Nox-ի իզոմերներ, որոնց հաշվարկային տեսակարար օպտիկական կլանումը 530 նմ-ում կազմում է համապատասխանաբար 0,35, 0,15 և 0,24 օպտիկական միավոր: Դեղնուցից, կաթից և ձկնկիթից անջատած այս Nox-երը ունեն մալոնային դիալդեհիդի (ֆոսֆոլիպիդային մնացորդների) բարձր պարունակություն, համապատասխանաբար 10,8±1,3; 12,3±2,0 և 14,6±2,1 մկՄ/մգ Nox-ում, $p<0,05$, $n=6$: Ներկայացված Nox-երը ունեն բնութագրական օպտիկական կլանման սպեկտրներ: Այս Nox-երի ֆոսֆոլիպիդային մնացորդների պարունակության և տեսակարար ՆԱԴՔԻH-կախյալ O_2^- -գոյացման ակտիվության միջև դիտվում է ուղիղ համեմատական կախվածություն: Կաթնասունների բջջաթաղանթների Nox-երի O_2^- -գոյացման ակտիվության համեմատ ձկնկիթի, կաթի և դեղնուցի Nox-երի ակտիվությունը ավելի է 3-4 անգամ: Այս կենսաքիմիական չափանիշները կարող են օգտագործվել որպես նշված սննդամթերքների որակի գնահատման նոր միջոց և որպես կովերի, ձկների ու հավերի հիվանդությունների բացահայտման զգայուն ախտորոշիչ թեստեր:

ՆԱԴՔԻH օքսիդազ – կաթ – ձվի դեղնուց – ձկնկիթ

For the first time, the fraction of isoforms of Nox were isolated by using the phenomenon of the formation of nonstable complex between hemoglobin and Nox, localized in the membran formations of the trout fish roe, hens egg yolk and exosomes of the milk. Their calculated specific optical absorptions at 530 nm were 0,35, 0,15 and 0,24, respectively. The isoforms of Nox from egg yolk, milk and caviar has increased content of malonic dialdehyde (residues of phospholipids): $10,8 \pm 1,3$; $12,3 \pm 2,0$ and $14,6 \pm 2,1$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ Nox, $p < 0,05$, $n=6$, correspondingly. These Nox has specific optical absorption spectra. The straight proportional dependence between content of the phospholipid residues and the specific O_2^- -producing activity of these Nox is observed. In comparison with the specific O_2^- -producing activity of the Nox from cell membranes of the mammals, the activity of the Nox from caviar, milk and egg yolk increases to 3-4 times. These biochemical indices can be used for evaluation of the quality of these food products, and as new and sensitive diagnostic tests for the diseases of dairy cows, fish and hens.

NADPH oxidase – milk – egg yolk – fish caviar

В настоящее время литературные данные о наличии NADPH оксидазной активности в икре рыб, желтке куриного яйца и коровьем молоке отсутствуют. С другой стороны, из молока коровы методом ультрацентрифугирования [6, 10] выделены экзосомы размером 40-100 нм. Экзосомы являются наночастицами, секретируемыми клетками. Они локализованы в биологических жидкостях и обеспечивают нормальное функционирование экстрацеллюлярной иммунной системы [9]. Экзосомы локализованы в сыворотке крови, жидкостях асцитных карцином и содержат изоформы экстрацеллюлярной NADPH оксидазы (eNox) [8]. Целью работы являлось выделение фракции изоформ Nox из экзосом молока коров, желтков куриных яиц, рыбьей икры и определение их свойств.

Материал и методика. *Выделение фракции Nox из икры форели.* Представленная ранее [10] процедура выделения Nox из икры несколько видоизменена. После гомогенизации икры (10 г) в воде (1:20 об/об) при 4°C в течение 3-х мин к нему добавляется гемоглобин (ферригемоглобин или феррогемоглобин – 50 μM , выделенный и очищенный из эритроцитов донорской крови) при pH 7,4-8. После инкубации этой смеси при 37° С в течение 2-х ч ее разбавляли в 25-30 раз и после инкубации в течение 20-25 мин при 4°C и центрифугирования при 5000 g супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52. Фракцию Nox элюировали 0,1 М калий фосфатным буфером pH 7,4 (КФБ).

Выделение фракции Nox из коровьего молока.

Выделение Nox из свежего коровьего молока (50 мл) включает те же процедуры, которые применялись при выделении Nox из икры с той разницей, что из колонки DE-52 Nox элюировали сначала 0,1 М КФБ, далее после разбавления элюата водой в 30 раз проводили ионообменную хроматографию на колонке DE-52. Фракцию Nox элюировали 0,04 М КФБ.

Выделение фракции Nox из желтков куриных яиц.

Выделение Nox из 2-х желтков (35-40 г) включает те же процедуры, которые применялись при выделении Nox из икры рыбы. Элюация Nox проводилась 0,1 М КФБ.

Определение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей активности фракции изоформ Nox. Активность определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [4]. Удельная O_2^- -продуцирующая активность была определена в расчете на 1 мл фракции Nox, полученной из 1 мл молока, 1 г желтка или 1 г икры рыбы.

Определение удельного содержания фракции изоформ Nox.

Расчетное удельное содержание (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм, β -полоса поглощения) изоформ Nox было определено в расчете на 1 мл Nox, выделенной из 1 мл молока, 1 г икры и 1 г желтка.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) в составе Nox.

Аскорбатзависимое перекисное окисление липидов (содержание малонового диальдегида в μM Nox) определяли оптическим спектральным методом, принимая молярную экс-тинкцию для МДА $-1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [1].

Определение молекулярных масс изоформ Nox. Молекулярные массы изоформ Nox приведенных источников определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция), используя в качестве стандарта цитохром С из сердца быка, церулоплазмин и трансферрин из плацентарной крови женщин и каталазу из легких быка.

В ходе получения Nox использовалась центрифуга К-70 (Германия). Оптические спектральные измерения проводили на спектрофотометре "Spercord UV/VIS" (Германия) с длиной оптического пробега – 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Небольшие видоизменения способа получения Nox [2] были осуществлены для удаления водонерастворимых липидсодержащих смесей, препятствующих проведению ионообменной хроматографии. Из колонки с целлюлозой DE-52 были элюированы белковые фракции, которые имели оптические спектральные показатели, характерные для изоформ Nox из мембран клеток, а также внутриклеточных и внеклеточных компонентов млекопитающих [8]. Указанные фракции в окисленном состоянии имеют форму оптических спектров и максимумы поглощения при 560 нм, 530 нм, 412 нм и 360 нм, а в восстановленном дитионитом натрия состоянии – при 558 нм, 525 нм, 418 нм и 365 нм (рис.1). После повторной ионообменной хроматографии на целлюлозе CM-52 и DE-52 форма оптических спектров поглощения изоформ Nox не изменяется. В результате гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 в случае Nox из икры и яиц выявлены две субъединицы с молекулярной массой около 22 и 91 кДа (это характерно для мембранных Nox [4]) и только в случае Nox из молока – одна субъединица с молекулярной массой до 75 кДа, что характерно для eNox из экзосом сыворотки крови млекопитающих или из экзосом жидкости асцитной карциномы различного характера [8]. После гель-фильтрации форма оптических спектров поглощения субъединиц изоформ Nox ощутимых изменений не претерпевает.

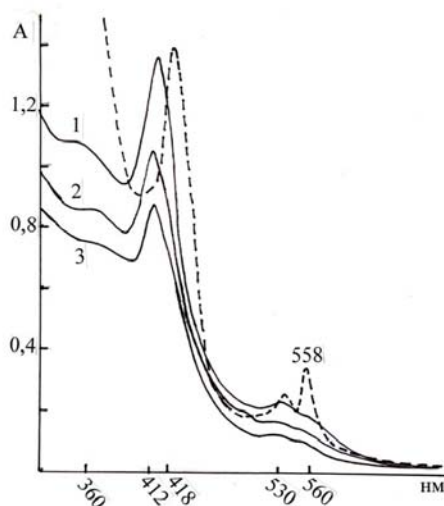


Рис. 1. Оптические спектры поглощения фракции изоформ Nox, выделенных из икры форели, выращенной в водоемах Армении (1); из свежего коровьего молока (2) и из желтков куриных яиц (3) после повторной хроматографии этих Nox на целлюлозе CM-52 и DE-52. После восстановления (1) дитионитом натрия появляется характерная форма и максимумов поглощения для Nox (цитохрома b_{558}) при 558 нм (----).

Если фракции Nox из икры рыбы и желтков куриных яиц из колонки с целлюлозой DE-52 элюируются 0,1 М КФБ, то фракция Nox из молока элюируется 0,04 М КФБ, что характерно для экстрацеллюлярной Nox (eNox), у которой, наряду с другими, имеется небольшое, но характерное для eNox поглощение при 485 нм [8]. Полученные данные свидетельствуют о том, что из икры и желтка получены фракции Nox, характерные для мембранных Nox, а из экзосом молока выделена eNox (рис.1). Однако плотность максимального оптического поглощения при 360 нм у полученных Nox (это свойственно для ФАД) из желтков яиц, икры и молока по сравнению с показателями Nox из других источников существенно повышена (в среднем до 2-2,5 раза). С другой стороны, количество фосфолипидных остатков в составе молекулы этих Nox, соответственно и уровень продукта аскорбат зависимой липидной перекисидации – малонового диальдегида (МДА), по сравнению с показателями Nox, выделенной из клеточных мембран, значительно выше (3-5 раз) [6]. Расчетное удельное содержание (расчетная плотность оптического поглощения при 530 нм) выделенных из икры Nox составляет 0,35 ое, из молока коровы – 0,24 ое, а из желтков куриных яиц – 0,15 ое. Интересно и то обстоятельство, что удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox из икры форели, из молока и куриных яиц составляет 62,5 ед/мл, 48,4 ед/г и 39,3 ед/г соответственно. Наблюдается прямопропорциональная зависимость между содержанием фосфолипидов в составе молекул этих Nox с их O_2^- -продуцирующей активностью. Эта активность в 3-4 раза превышает O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox из мембран клеток тканей млекопитающих (табл.1).

Таблица 1. Биохимические показатели фракции изоформ Nox из желтков куриных яиц, из коровьего молока и икры форели, n=6, p<0,05

Показатели изоформ Nox	1*	2	3
Расчетное удельное оптическое поглощение (A_{530})	0,15±0,03 (p=,005)	0,24±0,02 (p=,001)	0,35±0,04 (p=,003)
Расчетная удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуц. активн. ед/мл.	39,3±4,1 (p=,003)	48,4±0,4,9 (p=,01)	62,5±7,1 (p=,003)
Расчетное удельное оптическое поглощение при 360 нм	1,04±0,1 (p=,005)	1,15±0,3 (p=,01)	1,37±0,4 (p=,001)
МДА μ М/мл Nox	10,8±1,3 (p=,003)	12,3±2,0 (p=,002)	14,6±2,1 (p=,003)

*Примечание: Nox из желтков куриных яиц (1), из коровьего молока (2), из икры форели (3).

Такое увеличение O_2^- -продуцирующей активности Nox из приведенных пищевых продуктов с одной стороны, может быть связано с повышенным содержанием ФАД в составе этих ферментов (плотность оптического поглощения при 360 нм). С другой стороны, увеличение уровня эндогенных фосфолипидных остатков в составе молекул приведенных Nox может быть фактором повышения этой активности (известно, что NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox повышается под воздействием экзогенных фосфолипидов) [4, 5, 9].

Таким образом, впервые с использованием явления нестабильного комплексообразования между гемоглобином и локализованной в мембранных формированиях икры форели и желтков куриных яиц выделены изоформы Nox, а из экзосом молока коровы – eNox. Одновременно с увеличением содержания ФАД и фосфолипидных остатков в составе молекул этих ферментов наблюдается резкое повышение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этих Nox.

Эти биохимические показатели могут быть применены для оценки качеств приведенных пищевых продуктов, а также как новые и чувствительные диагностические тесты при заболеваниях дойных коров, а также рыб и кур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Методы определения перекисного окисления липидов биологических мембран. М., "Наука", 252 с., 1972.
2. *Симонян Р.М., Симомян Г.М., Симонян М.А.* Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
3. *Симонян Р.М., Симомян Л.А., Ширинян С.В., Алексанян А.С., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Алексанян С.С., Оганисян Г.А., Симонян М.А.* Новые биохимические показатели определения эффективности лечения злокачественного новообразования. *Вопр.теорет.клин.мед.*, 18, 2, 3-6, 2015.
4. *Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K.* Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med.* 76, 208-226, 2014.
5. *Meijles D.N., Fan L.M., Howlin B.J., Li J.M.* Molecular insights of p47phox phosphorylation dynamics in the regulation of NADPH oxidase activation and superoxide production. *J. Biol Chem.*, 289, 33, 22759-22770, 2014.
6. *Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Nonnecke B.J., Sacco R.E.J.* Bovine milk exosome proteome. *Proteomics*, 75, 5, 1486-1492, 2012.
7. *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): 16-21, 2014.
8. *Simonyan R.M., Chailyan G.S., Shrinian S.V., Simonyan G.M., Alexanyan S.S., Simonyan M.A.* Inadequate changes of the level and activity of extracellular NADPH oxidase, isolated from fluid's nanoparticles of ascitic human lung carcinoma depending on the duration of the disease. In intern simp. NANO Moscau, Jule 13-18. P.144, 2014.
9. *Streeter J., Schickling B.M., Jiang S., Stanic B., Thiel W.H., Gakhar L, Houtman J.C., Miller F.J.* Phosphorylation of Nox1 regulates association with Nox A1 activation domain. *Circ Res.*, 115, 11, 911-918, 2014.
10. *Yamada T., Inoshima Y, Matsuda T, Ishiguro N.* Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J. Vet Med Sci.* 74, 11, 1523-1525, 2012.

Поступила 13.10.2015