

рН-ЗАВИСИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СПЕКТРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ЛЕГКИХ КРЫС

СИМОНЯН РУЗАН

*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Института биохимии НАН РА, доцент ГГУ*

Изоформы NADPH оксидазы (Nox) являются важными агентами регуляции иммунной системы организма и окислительно-восстановительных метаболических процессов [1]. Аналогично другим ферментным системам Nox очень чувствительна к изменениям рН среды. В частности, интенсивность переноса электронов Nox в эозинофилах человека максимальная при рН 7,5 и снижается при повышенных или пониженных рН среды [2]. В другой работе определяется интенсивность переноса электрона Nox в плазматических мембранах фагоцитирующих лейкоцитов. При этом Zn(+2) существенно снижает продуцирование супероксидов этими клетками при нейтральных рН среды [3]. В результате инкубации полиморфонуклеарных лейкоцитов лошади с олеатом или линолеатом наблюдается повышение этими клетками продуцирование супероксидов (O_2^-) при рН 7 [4]. Используя метод флюоресцентного анализа было показано, что Nox в гранулоцитах полиморфонуклеарных лейкоцитах оказывает оптимальную активность при рН 5,5-6 [5]. Однако определение диапазона рН среды на обратимость формы и интенсивности оптических спектров поглощения Nox *in vitro* еще не определены. Определение этих показателей даст возможность более осторожному подходу к рН среды при выделении и очистки изоформ Nox и определении их стабильности.

Целью работы являлось определение границ рН, при которых наблюдается обратимость изменений оптических спектров поглощения суммарной фракции изоформ Nox из мембран клеток легких крыс, как важного аэробного метаболита первоначального воздействия внешних повреждающих чужеродных агентов, проникающих в организм вместе с воздухом.

Материал и методы

Изоформы суммарной фракции Nox (субединицы р_{нох} 22 и р_{нох} 91 кДа) из мембран клеток легких крыс получали лицензированным способом, с использованием явления комплексообразования между ферригемоглобином

(выделен и очищен из гемолизата эритроцитов донорской крови человека) и Nox, которая локализована на поверхностных слоях клеточных мембран. Суммарную фракцию Nox из колонки с целлюлозой DE-52 элюировали 0,1 М калий фосфатным буфером (КФБ) рН7,4 [6]. рН раствора Nox (по 10 мл) с плотностью характерного максимального оптического поглощения при 530 нм (β полоса поглощения на оптическом спектре) $A_{530} = 0,13$ оптических единиц изменяли 0,1М соляной кислотой или 0,1 М КОН (время аэробной инкубации раствора Nox после добавления этих веществ составляло 5 мин при 20°C). Далее регистрировали оптические спектры поглощения растворов Nox при нейтральных рН среды (7,4) и при экстремальных рН (11,0 и 3,0).

Оптические спектры поглощения Nox регистрировали на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия), с длиной оптического пробега – 1 см. В ходе работы были использованы центрифуги К-70 и К-24 (Германия). Опыты повторялись шесть раз ($n=6$).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерии достоверности «р».

Результаты и обсуждения

Оптические спектры поглощения водно-буферных растворов Nox из мембран клеток легких крыс при рН7,4 и после добавления соляной кислоты до рН4, рН3 и после добавления КОН до рН7,4; при рН 7,4 после добавления КОН до рН11 и после добавления соляной кислоты до рН 7,4 приведены на (рис.1-3).

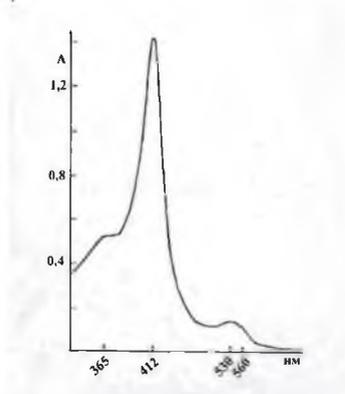


Рис.1. Оптический спектр раствора Nox из мембран клеток легких крыс при рН7,4 в окисленном остоянии.

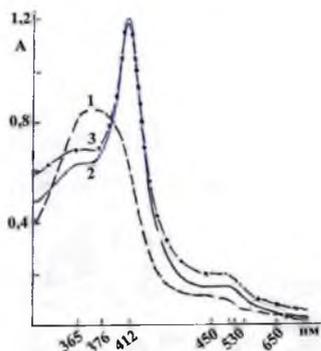


Рис.2. Оптические спектры поглощения Nox из мембран клеток легких крыс при pH3 или pH4 (1), после добавления к раствору этих Nox 0,1 М КОН до pH7,4 (3,2). Помутнение раствора Nox (3) исчезает при его инкубации 8-10 мин при 20°C.

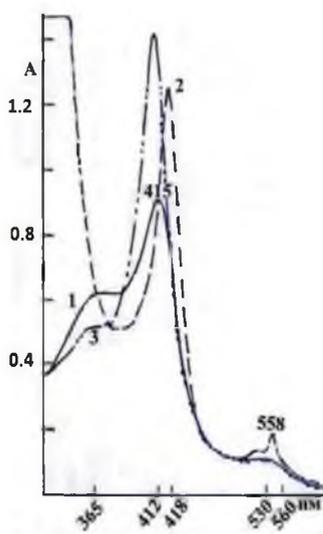


Рис.3. Оптические спектры поглощения Nox из мембран клеток легких крыс при pH11 (1), после добавления к раствору Nox 0,1 М соляной кислоты до pH7,4 (3) и после восстановления этой Nox дитионитом натрия (2).

Величины оптических спектральных индексов Nox при pH среды 7,4 (A_{412}/A_{530} и A_{412}/A_{365}), pH3 (A_{376}/A_{543}) и после добавления КОН до pH 7,4 (A_{376}/A_{543}), при pH11 (A_{415}/A_{530} , A_{415}/A_{365}) и после добавления 0,1 М соляной кислоты до pH 7,4 (A_{412}/A_{530} и A_{412}/A_{365}) приведены на таблице.

Таблица

pH зависимое изменение оптических спектральных индексов Nox из мембран клеток легких крыс ($n=6$, $p<0,05$).

pH	A_{412}/A_{530}	A_{412}/A_{365}	A_{376}/A_{543}	A_{415}/A_{530}	A_{415}/A_{365}
7,4	$10,14 \pm 0,6$ ($p=0,005$)	$2,84 \pm 0,5$ ($p=0,001$)	-	-	-
3	-	-	$8,3 \pm 0,3$ ($p=0,01$)	-	-
3 --- 7,4	$9,8 \pm 1,1$ ($p=0,003$)	$1,74 \pm 0,2$ ($p=0,001$)	-	-	-
11	-	-	-	$8,3 \pm 0,4$ ($p=0,002$)	$1,47 \pm 0,2$ ($p=0,003$)
11---7,4	$12,9 \pm 0,7$ ($p=0,001$)	$2,8 \pm 0,6$ ($p=0,02$)	-	-	-

Как показано на рис.1 при pH 7,4 форма оптического спектра Nox из мембран клеток легких крыс в окисленном состоянии свойственна Nox: имеются характерные максимумы оптического поглощения при 365 нм, 412 нм, 530 нм и 560 нм. После восстановления Nox дитионитом натрия наблюдается характерные максимальные поглощения уже при 365 нм, 418 нм, 535 нм и 558 нм (рисунок не приводится). Величины оптических спектральных индексов (A_{412}/A_{530} и A_{412}/A_{365}) составляют $10,14 \pm 0,6$ ($p=0,005$) и $2,84 \pm 0,5$ ($p=0,001$, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что при физиологических pH среды нативность Nox сохраняется.

Однако форма оптического спектра Nox резко изменяется при pH 4 и pH3 (рис.2). В этих условиях исчезает поглощение гемовой группы Nox при 412 нм (поглощение Core) и поглощения при 530 и 560 нм. Появляются новые максимумы поглощения при 376 нм, 450 нм и 650 нм. Фактически при 5 минутной аэробной инкубации растворов Nox из мембран клеток легких крыс при pH 4 и, особенно, pH3 нативность Nox не сохраняется. Однако эти изменения носят обратимый характер: при повышении pH среды форма оптических спектров практически приобретает форму оптических спектров нативной Nox (рис.2). Низкая граница pH, при которой наблюдается обратимость оптических спектров Nox из мембран клеток легких крыс составляет до pH 3 (ниже этой границы оптические спектральные изменения носят необратимый характер).

При повышении pH растворов Nox до 11, плотность максимального оптического поглощения вместо 412 нм наблюдается при 415 нм, с существенным снижением плотности оптического поглощения (Таблица).

Однако эти изменения носят обратимый характер. При снижении pH раствора Nox соляной кислотой до pH 7,4 практически наблюдается приближение формы и интенсивности поглощения этой Nox к показателям при pH 7,4. При этом окислительно-восстановительные показатели Nox также приближаются к показателям нативной Nox (наблюдается характерное поглощение для нативной Nox при 558 нм). Выше pH 11 наблюдается коренные необратимые изменения оптических спектральных показателей этой Nox (рис.3). Механизмы действия pH 3-11 скорее всего ассоциированы с действием гидроксильных ионов и протонов на окружающие агенты железа гемовой группы, а также ФАД в составе молекулы Nox [7], приводящих к соответственным изменениям формы и интенсивности оптических спектров поглощения.

Таким образом, граница обратимости изменений форм оптических спектров поглощения Nox из мембран клеток легких крыс составляет до pH 11. Приведенные изменения границ pH (3-11) при которых наблюдается обратимость изменений формы оптических спектров или нативности Nox из мембран клеток легких крыс видимо обусловлены тем, что легкие являются первичной биосистемой, переносящий вместе с воздухом различного характера экзогенных токсических агентов, проникающие в организм вместе с воздухом. Фактически Nox из мембран клеток легких имеет высокое противодействие против H^+ и HO^- .

Ключевые слова: NADPH оксидаза, pH- зависимое изменение.

Список использованной литературы

1. **Brandes R. P., Weissmann N., Schröder K.** Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. 2014, 76:208-226.
2. **Deri Morgan, Vladimir V. Cherny, Ricardo Murphy, Ben Z. Katz, and Thomas E DeCoursey** The pH dependence of NADPH oxidase in human eosinophils. J.Physiol. 2005, 569(Pt 2): 419-431.
4. **Thomas E. DeCoursey, Deri Morgan & Vladimir V. Cherny** The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. Nature // 2003, 422, 531-534
5. **Heyneman R. A.** Activation of a NADPH Oxidase From Horse Polymorphonuclear Leukocytes in a Cell Free system // Journal of Leukocyte Biology 1984, 36: 751-759.
6. **D. Iverson, L. R. DeChatelet, J. K. Spitznagel, and P. Wang** Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay // J Clin Invest., 1977, 59(2): 282-290.

7. **Симонян Р. М., Симонян Г. М., Симонян М. А.**, Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем // Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014 թ.

8. **Fuhler GM, Hooijenga F, Drayer AL, Vellenga E.** Reduced expression of flavocytochrome b558, a component of the NADPH oxidase complex, in neutrophils from patients with myelodysplasia // Exp Hematol. 2003 31(9):752-759.

ԱՌՆԵՏԻ ԹՈՔԻ ԲԶՋԱԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՆԱԴՐՄ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ՕՊՏԻԿԱԿԱՆ ԱՊԵԿՏՐԱԼ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՐՄ ԿԱԽՅԱԼ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ՄԻՄՈՆՅԱՆ ՌՈՒԶԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, ԳՊՀ դոցենտ,
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի
ինստիտուտի ավագ գիտաշխատող*

Առաջին անգամ որոշվել է առնետի թոքի բջջաթաղանթներից հեմոգլոբինով արտազատված ՆԱԴՐՄ օքսիդազի (Nox)՝ թԻ-ի փոփոխման տիրույթից կախված օպտիկական կլանման սպեկտրների ձևի և ինտենսիվության դարձելի շեղումները: Nox-ի անջատումը իրականացվում է առանց դետերգենտի օգտագործման, քանի որ վերջինս մասնակիորեն դենատուրացնում է ֆերմենտը: Nox-ի լուծույթին ավելացվում է 0,1Մ աղաթթու (pH3 կամ ավելի ցածր) կամ 0,1 Մ KOH (մինչև pH 11 կամ բարձր) և ինկուբացվում 20° C-ում 5 րոպե: KOH կամ HCl ավելացնելով այդ լուծույթներին՝ դրանց թԻ-ը հասցվում է 7,4-ի: Nox-ի օպտիկական սպեկտրների ձևը և կլանման ինտենսիվությունը թԻ-ի այս տիրույթում (3-11) փոփոխվում են դարձելիորեն: թԻ-ի այս տիրույթից դուրս դիտվում է այս ֆերմենտի անդարձելի դենատուրացում: Թոքերի Nox-ի այսպիսի փոփոխությունները, հավանական է, պայմանավորված են այն հանգամանքով, որ թոքերը օրգանիզմ են տեղափոխում էկզոգեն տոքսիկ ազնետներ օդի հետ միասին:

Այսպիսով, թոքի բջջաթաղանթներում տեղակայված Nox-ը ցուցաբերում է բարձր դիմադրողականություն թթվահիմնային բնույթի էկզոգեն ազնետների հանդեպ:

Բանալի բառեր՝ ՆԱԴՐՄ օքսիդազ, թԻ-կախյալ փոփոխություններ:

THE pH-DEPENDENT CHANGES OF OPTICAL SPECTRAL INDICES OF NADPH OXIDASE FROM RATS LUNG CELL MEMBRANES

SIMONYAN RUZAN

*Candidate of Biology, GSU Assistant Professor,
Senior Scientist of the H. Buniatyan
Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan*

The pH-range related reversible changes of the form and intensity of optical absorption spectra of the Nox isolated from rats lung cell membranes is determined for the first time. The Nox is implemented without detergents, which denaturize the enzyme. The 0,1 M hydrochloric acid (pH 3 or lower) or 0,1 M KOH (up to pH 11 or higher) are added to the solution of this Nox and incubated at 20° C for 5 min. KOH or HCl should be added to these solutions to reach their pH to 7,4. The form and intensity of the optical absorption spectra of Nox in these ranges of pH (3-11) are changed reversibly. Out of these ranges the irreversible denaturation of this enzyme is observed. It is possible, that these changes of the Nox are conditioned by the fact that lung transfers various exogenous toxic agents with the air to the organism.

Thus, the Nox localized in the lung cell membranes indicates high counteraction against exogenous agents of alkaline-acidic character.

Key words: *NADPH oxidase, pH-dependent changes.*

Հոդվածը ներկայացվել է խմբագրական խորհուրդ 15.03.2019թ.:

Հոդվածը գրախոսվել է 19.04.2019թ.: