

УДК 599.332.72.616

Г. Р. Агамян

**Воздействие пролин-богатого полипептида на эндогенный
уровень металлопротеинов анти- и прооксидантной активности
в тканях белых крыс**

(Представлено академиком К. Г. Карагезяном 15 /IX 2006)

Ключевые слова: *пролин-богатый полипептид, металлопротеины, ткань*

Воздействие синтетического аналога пролин-богатого полипептида -1 (ПБП-1) на различного характера биосистемы интенсивно исследуется уже больше 15 лет. Эти исследования показали, что ПБП-1 обладает антимикробным, иммуномодуляторным, нейропротективным и кардиопротективным эффектами [1,2]. При повышенных концентрациях (больше 80 мкг) ПБП-1 обладает способностью стимулировать процесс продуцирования гидроксильных радикалов (НО[•]) [3], однако по предварительным результатам при относительно низких концентрациях (0.1-5 мкг), наоборот, обладает способностью улавливать гидроксильные радикалы, оказывая антиоксидантный эффект. Таким образом ПБП-1 защищает многие металлопротеины, которые денатурируются гидроксильными радикалами, например, некоторые металлопротеины антиоксидантной (МАО) и прооксидантной (МПА) активности, оказывая антистрессорный эффект при различного характера проявлениях оксидативного стресса, особенно в тех случаях, когда наблюдается повышение уровня перекиси водорода в различных формированиях тканей. Эти явления наблюдаются при канцерогенезе, алюминиевой интоксикации, интоксикации тяжелыми металлами, гипогликемии, гемосекции спинного мозга [4-8]. ПБП-1 стабилизирует и эритроцитарные мембраны (ЭМ), подавляя процесс рилизинга изоформ цитохрома (цит) b 558 из их мембран [9]. Однако механизмы воздействия ПБП-1 на уровень МАО и МПА в тканях здоровых крыс в отсутствии оксидативного стресса комплексно еще не определены.

Цель работы состоит в определении воздействия экзогенно введенного ПБП-1 на уровень МАО и МПА в крови и других тканях здоровых крыс под влиянием экзогенно введенного ПБП-1.

Белым половозрелым здоровым крысам (12 животных) массой 200-250 г внутрибрюшинно было введено по 10 мкг/ мл ПБП-1 всего три раза через каждые двое суток. Контрольным животным был введен физиологический раствор в аналогичном режиме (по 0.5 мл). Крысы были декапитированы под легким эфирным наркозом. Кровь стабилизировали 2%-ным оксалатом натрия в условиях легкого перемешивания в ходе набора крови. Кровь животных опытной и контрольной групп (по 35 мл) была далее инкубирована в аэробных условиях *in vitro* при 4⁰ в течение 4 суток. Это делается для синтеза *in vitro* сывороточных цит b558 как новых и важных компонентов защиты крови от повреждающих эффектов перекиси водорода.

МАО (Cu, Zn-СОД и каталаза из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) и МПА (цит b5 из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цит b558 ЭМ - цит b558III и цит b558IV, цит b558 нейтрального характера, O_2^- - продуцирующий липопротеин сыворотки - супрол) выделяли и очищали биотехнологическим способом путем ионообменной хроматографии белковых фракций сыворотки, растворимой части эритроцитов и ЭМ на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52 ("Whatman", Англия), сефадексе ДЕАЕ А-50 ("Pharmacia", Швеция) и гель-фильтрации на сефадексах G-100 и G-150 (Pharmacia). Цит b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [10,11]. Количество МП определяли путем измерения характерной для данного белка плотности максимального оптического поглощения: для цит b5 - 525, изоформ цит b558 - 530, супрола - 430, ЦП - 610 и ТФ - 470 нм. Активность супероксиддисмутазы определяли общеизвестным методом нитротетразолиевого синего (НТС), путем измерения процента ингибирования образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами.

МАО (суммарная фракция Cu,Zn-СОД и Mn-СОД, каталаза) и МПА (цит С) выделяли из тканей крыс биотехнологическим способом, с небольшим видоизменением с целью получения также цит С и каталазы [12].

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пробега 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера, с определением критерия достоверности Р.

Таблица 1

Относительное изменение (%) уровня МПА и МАО в крови белых крыс под воздействием экзогенно введенного ПБП-1, по сравнению с 100% контрольными показателями (Р < 0.05, n = 8)

Металлопротеины	%
Цит b5	-25.0+/-3.1
Цит b558 сыворотки	+102.4 +/- 8.8
Цит b558III ЭМ	- 80.6 +/- 6.1
Цит b558IV ЭМ	- 60.9 +/- 4.8
Цит b558 нейтрального характера из ЭМ	+ 91.7 +/- 6.5
Супрол	+ 77.6 +/- 5.4
Церулоплазмин	+ 11.6 +/- 2.0
Трансферрин	+ 59.5 +/- 4.0
Cu,Zn-СОД	+ 16.0 +/- 1.8
Каталаза	- 35.2 +/- 2.4

В результате трехкратного введения крысам по 10 мкг ПБП-1 и дальнейшего инкубирования крови в аэробных условиях при 4° in vitro уровень МАА и МПА претерпевает своеобразное изменение (табл.1). Наблюдается снижение уровня цит b5, компонента для НАДРН-зависимой метгемоглобин редуктазы в цитозоле эритроцитов [13]. Это свидетельствует о некотором повышении подвижности животных. Феноменальным можно считать почти двукратное увеличение уровня синтезированных ex vivo сывороточных цит b558, смягчающих пагубные последствия перекиси водорода в сыворотке крови и показывающих высокую резистентность этих цитохромов против перекиси водорода, по сравнению с другими гемопротеинами, включая и изоформы цит b558 ЭМ [14]. Уровень цит b558 ЭМ значительно снижен под воздействием ПБП-1, чему способствует подавление процесса рилизинга изоформ цит b558 пролин-богатым полипептидом [9]. Это вовсе не указывает на уменьшение уровня цит b558 в ЭМ, так как значительная часть цит b558 остается еще в "иммобилизованном" состоянии и отщепляется специальным методом (вторичной обработкой этих ЭМ). Однако в опытной группе резко повышается уровень цит b558 ЭМ нейтрального характера, что свидетельствует об определенном превращении части цит b558III кислого характера в цитохром b558 нейтрального характера. Это своеобразный ответ адаптационных механизмов организма на внешние факторы, каким и является ПБП-1 (такой эффект наблюдается при различных заболеваниях). Положительным воздействием ПБП-1 на здоровый организм можно считать увеличение уровня липопротеина сыворотки высокой плотности - супрола с повышением его стабильности. Это является важным фактором сохранения вязкости сыворотки и в целом сохранения гемодинамики.

В приведенном режиме ПБП-1 вызывает повышение уровня МАА (ЦП, ТФ и Cu,Zn-СОД), но уровень каталазы продолжает несколько снижаться из-за деградирования при аэробном инкубировании, а ПБП-1 фактически не способен полностью останавливать процесс инактивирования каталазы. В крови опытной группы под влиянием ПБП-1 изменение расчетного суммарного уровня МАА (антиоксидантный статус) и суммарный расчетный уровень МПА (прооксидантный статус) в целом составляет +52.6 и +95.2% соответственно, по сравнению с 100%-ными контрольными показателями. Таким образом, под влиянием экзогенно введенного ПБП-1 прооксидантный статус крови увеличивается почти в 2 раза по сравнению с антиоксидантным статусом, в основном из-за увеличения уровня сывороточных цит b558.

Таблица 2

Относительное изменение (%) уровня МАА и МПА в тканях белых крыс под влиянием экзогенно введенного ПБП-1 по сравнению с 100% контрольными показателями ($P < 0.05$, $n = 8$)

Ткань	Цит С	Cu,Zn-СОД + + Mn-СОД	Каталаза
Мозг	-47.4 +/-6.1	-61.9 +/- 3.7	+ 2.1 +/- 0.3
Костный мозг	-16.7 +/- 2.8	+ 375.5 +/- 31.9	+ 3.3 +/- 0.4

Тимус	- 8.9 +/-1.2	- 24.3 +/-5.0	+ 3.3 +/- 0.4
Селезенка	+ 29.4 +/- 5.1	+ 23.7 +/- 2.7	+ 18.2 +/- 3.2
Печень	- 5.7 +/- 0.6	+ 2.2 +/- 0.5	- 29.6 +/- 3.2
Сердце	-101 +/- 1.3	-3.1 +/- 0.2	-11.4 +/- 2.2
Почки	-28.6 +/- 3.7	+ 4.4 +/- 1.2	+ 5.8 +/- 0.6

Уровень МАА (фракция Cu,Zn-СОД+Mn-СОД, каталаза) и МПА (цит С) в различных тканях изменяется по-разному. Уровень цит С снижается в мозговой ткани, костном мозге, тимусе, печени, сердце и почках от 5.7 до 47.4%. Снижение уровня цит С особенно ощутимо в мозговой ткани (табл.2). Увеличение уровня цит С наблюдается только в селезенке. Суммарная активность Cu,Zn-СОД и Mn-СОД снижается в мозговой ткани и тимусе, но практически не изменяется в печени, сердце и почках. Феноменальным можно считать почти четырехкратное увеличение активности суммарной фракции Cu,Zn-СОД и Mn-СОД в костном мозге, основного фактора гемопоэза. В селезенке также наблюдается увеличение активности этих ключевых антиоксидантных ферментов. Фактически ПБП-1 вызывает повышение антиоксидантной активности органов, ответственных за иммунный ответ. Видимо, таков механизм действия ПБП-1 при модулировании иммунитета организма [2]. Однако ПБП-1 вызывает снижение активности каталазы в печени и некоторое - в сердечной ткани. Ее активность увеличивается только в селезенке. В других тканях активность каталазы практически не изменяется. Фактически под влиянием ПБП-1 в здоровом организме наблюдается характерное изменение уровня МАА и МПА крови и других тканей с резким увеличением уровня сывороточных цит b558, цит b558 ЭМ нейтрального характера, а также активности Cu,Zn-СОД и Mn-СОД в костном мозге, что создает определенный дисбаланс между продуцирующими и утилизирующими АФК металлопротеинами.

Таким образом, адаптационные механизмы по-разному откликаются на действие внешних факторов, каким, в частности, является ПБП-1, в здоровом организме и при заболеваниях с характерным фоном оксидативного стресса, при котором ПБП-1 оказывает антистрессорный эффект [4-6], регулируя эндогенный уровень МАА и МПА в различных тканях, включая и кровь. При этом чувствительность к ПБП-1 больше в органах, ответственных за иммунитет организма (селезенка, костный мозг и тимус).

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыя НАН РА

Գ. Ռ. Աղամյան

**Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի (ՊՀՊ-1) ազդեցությունը հակա- և
պրոօքսիդանտային ակտիվության մետաղապրոտեինների էնդոգեն
մակարդակի վրա սպիտակ առնետների հյուսվածքներում**

Օրգանիզմի հարմարվողական մեխանիզմները տարբեր կերպ են արձագանքում արտաքին գործոններին՝ մասնավորապես ՊՀՊ-1-ի ազդեցությանը օքսիդատիվ սթրեսի բնութագրական ֆոնի բացակայության և առկայության պայմաններում: Վերջինիս դեպքում ՊՀՊ-1-ը ցուցաբերում է հակասթրեսային ազդեցություն՝ կարգավորելով հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակները տարբեր հյուսվածքներում, ներառյալ արյունը: Այդ տեսակետից ՊՀՊ-1-ի հանդեպ առավել զգայնություն են ցուցաբերում իմունային համակարգին մասնակից օրգանները (վալժախ, ոսկրածուծ և թիմուս):

G. R. Aghamyan

**The Influence of Intraperitoneal Injected Proline-rich Polypeptide
(PRP-1) on the Endogenous Level of Metalloproteins Anti- and
Prooxidative Activity in White Rats Tissues**

The adaptive mechanisms of the organism differently react to the influence of external factors - the PRP-1 of a healthy organism and at diseases with a characteristic oxidative stress, during which the PRP-1 causes antistressor effect, by regulation of endogenous level of metalloproteins antioxidative activity and metalloproteins prooxidative activity, in various tissues, including the blood. The sensitivity towards PBP-1 is more in organs which are responsible for the immunity of the organism (spleen, bone marrow and thymus).

Литература

1. *Galoyan A. A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus-Endocrine Heart. Moscow. Nauka. 1977. 240 p.
2. *Galoyan A. A.* Brain Neurochemistry cytokins: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic Plenum Publisherrs. N.-Y. 2004. 188p.
3. *Knaryan V., Samannatary S., Galoyan A., Mohanakumar K.* - Neuroscience Lett. 2005. V. 375. P. 187-191.
4. *Симонян Г. М., Нерсисян А. К., Симонян Р. М., Бабалян М. А., Симонян М. А.* - Нейрохимия. 2005. Т. 22. С. 125-130.
5. *Agadjanyan M. I., Vahradyan A. G., Simonyan M. A., Galoyan A. A.* In: Report of VI Intern. Conf. AD. Spain. Barcelona. 2002. P. 152.
6. *Оксузян Г. Р., Симонян М. А., Галоян А. А.* - ДНАН РА. 2003. Т. 103. С. 160-166.
7. *Варданян А. Р., Симонян Р. М., Бабалян М. А., Геворкян Д. Н., Симонян М. А.* - Нейрохимия. 2004. Т. 21. С. 289-292.
8. *Sulkhanyan R. M., Chavushyan E. A., Sarkissian J. S., Galoyan A. A.* - 34 rd ASN Annual Meeting (USA). Neurochemistry. 2003. V. 85. P. 16.
9. *Симонян Р. М., Симонян Г. М., Бабалян М. А., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. Т. 43. С. 13-18.
10. *Симонян М. А., Симонян Г. М.* Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. No 341 Армпатента. Ереван. 1997.
11. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Симонян Р. М.* Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет No 908 Армпатента. Ереван. 2001.
12. *Симонян М. М.* Способ получения СОД из животного сырья. Открытия, изобрет. (СССР). 1988. Т. 28. С. 107.
13. *Passon P. G., Hultquist D. E.* - Biochim. Biophys Acta. 1972. V. 273. P. 62-73.
14. *Симонян Г. М., Симонян Р. М., Симонян М. А.* В кн: Актуальные вопросы военной медицины. Ер. гос. мед. ун-т. им. М. Гераци. Ереван. 1999. С. 48-51.