

БИОХИМИЯ

УДК 539.166.612.14

Г. М. Симонян, Г. Р. Агамян, М. А. Симонян, академик А. А. Галоян

Влияние амидированного аналога богатого пролином полипептида на уровень и активность металлопротеинов тканей крыс *in vitro* и *ex vivo*

(Представлено 3/XI 2006)

Ключевые слова: *металлопротеины, ткань, амидированный богатый пролином полипептид*

Синтетический аналог богатого пролином полипептида (БПП-1) из нейросекреторных гранул нейрогипофиза [1] оказывает положительное воздействие при различного рода заболеваниях, большей частью проявляя антистрессорный и иммуномодулирующий эффекты [2-5]. Причем, по предварительным результатам, БПП-1 при сравнительно низких количествах (ниже 10 мкг/мл) обладает способностью улавливать высокотоксичные гидроксильные радикалы (НО.), а при высоких концентрациях (80 мкг/мл и выше), наоборот, стимулировать продуцирование этих радикалов [6]. Механизмы воздействия БПП-1, возможно, связаны и с тем, что он повышает метгемоглобин(метHb)-восстанавливающую активность цитохрома (цит) b558III эритроцитарных мембран (ЭМ), тем самым улучшая кислородный гомеостаз [7]. С другой стороны, цит 558 в своем составе имеет богатый пролином пептид [8] и не исключается, что цит b558 как рецептор может связывать экзогенный БПП 1. Учитывая то обстоятельство, что цит b558 различного характера локализованы в мембранах клеток иммунной системы (включая и клетки селезенки, костного мозга и тимуса) и являются кофакторами НАДРН-оксидаз для генерирования супероксидных радикалов (O_2^-) при фагоцитозе [9-11], становится очевидной важная роль БПП-1 в иммунной системе.

В 2004 г. был открыт новый амидированный аналог БПП - Gx-NH₂, который обладает высокой антибактериальной активностью, в частности

против *Bacillus Anthrax in vivo*. Существует предположение, что нативный Gx-NH₂ в мозге находится в амидированной форме и, с другой стороны, при выделении и очистке этого полипептида происходит его дезамидирование [12]. Однако характер изменения свойств металлопротеинов под воздействием Gx-NH₂ еще не определен.

Целью работы являлось определение механизмов воздействия Gx-NH₂ на уровень и активность анти- и прооксидантных металлопротеинов крови и органов иммунной системы организма (селезенка, костный мозг и тимус) *in vitro* и *ex vivo*.

Металлопротеины (МП) антиоксидантной активности (МАО): Cu, Zn-СОД, каталаза, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ), и металлопротеины прооксидантной активности (МПА): новые изоформы цит b558 из эритроцитарных мембран и мембран клеток (МК) селезенки (МКС), костного мозга (МККМ) и тимуса (МКТ), сывороточные цитохромы b558, а также сывороточный липопротеин - супрол и цит b5 из цитозоля эритроцитов, получали биотехнологическим способом при помощи ионообменной хроматографии на целлюлозах ДЕ 52, КМ 52 и сефадексе ДЕАЕ А-50 и гель-фильтрации на сефадексах G-75, G-150 белковых фракций цитозоля эритроцитов, ЭМ, МКС, МККМ, МКТ, а также сыворотки [13], без употребления детергента [14]. При этом цитохромы b5, b558I, b558II, b558III, b558IV, Cu, Zn-СОД, ЦП и ТФ получали в электрофоретически гомогенном состоянии, остальные металлопротеины имели до 90-96% чистоты.

В первой серии экспериментов было определено влияние Gx-NH₂ (10 мкг/мл) на оптические спектральные характеристики МАО и МПА путем инкубирования Gx-NH₂ с этими МП в течение 48 ч при 4°C в аэробных условиях *in vitro*. Во второй серии экспериментов были инкубированы кровь, МКС, МККМ и МКТ с Gx-NH₂ (10 мкг/мл) в течение 5 дней при 4°C в аэробных условиях *ex vivo*. Часть крови и МК инкубировали в аналогичных условиях в отсутствие Gx-NH₂ (контроль). Было использовано по 30 мл крови белых крыс, 20 г селезенки, 5 мл костного мозга и 10 г тимуса. ЭМ и МК указанных тканей (по 10 мл) использовали для определения метНв-восстанавливающей и НАДРН-зависимой O₂⁻ продуцирующей активности изоформ цит b558 в гетерогенной фазе (непосредственно в мембранах) путем добавления определенного количества (до 0.4 мл) смеси очищенных мембран, смешанных с 0.04 М калий фосфатным буфером (КФБ), рН 7.4. Основная часть крови и МК была использована для получения МАО и МПА (в отсутствие и присутствии Gx-NH₂). НАДРН-зависимую O₂⁻-продуцирующую активность изоформ цит b558 из ЭМ и МК тканей и супрола определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем вычисления

процента стимулирования (или подавления - в случае супероксиддисмутазы) образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. МетНб-восстанавливающую активность изоформ цит b558 определяли, используя ферриНб (метНб) крыс или человека [7]. При этом величина плотности альфа-поглощения метНб (при 565 нм) составляла 0.8, а величина поглощения бета-полосы используемого цит b558 в реакционной смеси - 0.04. После инкубирования реакционной смеси в течение 18-20 ч при 20-25° и быстрого смешивания определяли кинетику восстановления метНб до ферроНб, путем измерения снижения интенсивности плотности альфа-поглощения метНб в течение 1-1.5 ч. Это снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроНб, который имеет максимальное оптическое поглощение при 555 нм.

Количество МАА и МПА определяли путем измерения плотности характерного максимального оптического поглощения: для Cu, Zn-СОД при 680 нм, ЦП - 610, ТФ - 470, цит b5 - 525, изоформ цит b558 - 530 (окисленная форма) и супрола - при 430 нм.

Оптические спектральные измерения осуществляли на спектрофотометре "Specord UV/VIS" (Германия), с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента - Фишера, с определением критерия достоверности P.

Инкубирование Gx-NH₂ с МАА и МПА в течение 48 ч практически не приводит к изменению оптико-спектральных показателей МАА (Cu, Zn-СОД, каталаза, ЦП, ТФ). Не изменяются и активности этих МП. Это свидетельствует о том, что Gx-NH₂ не является экзогенным денатурирующим агентом для ключевых антиоксидантных ферментов и ЦП. Однако Gx-NH₂ существенно изменяет активность МПА после непосредственного воздействия на них *in vitro* (табл. 1). Gx-NH₂ (10 мкг/мл) снижает O₂⁻-продуцирующую активность супрола и цит b558III, цит b558 МКС и МКТ в гомогенной фазе (в растворе). При инкубировании крови, МКС, ММКМ и МКТ с Gx-NH₂ (10 мкг/мл) *ex vivo* направленность этих изменений в основном сохраняется. После инкубирования крови с Gx-NH₂ *ex vivo* и выделения из сыворотки этой крови супрола его O₂⁻-продуцирующая активность продолжает снижаться. По сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие Gx-NH₂) существенно повышается только O₂⁻-продуцирующая активность цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ). Несколько снижается O₂⁻-продуцирующая активность цит b558 в МКС и МКТ (гетерогенная фаза). Таким образом Gx-NH₂ в основном снижает O₂⁻-продуцирующую активность супрола и изоформ цит b558 ЭМ и МК органов иммунной системы. Различие

действия Gx-NH₂ *in vitro* и *ex vivo* в этом аспекте, возможно, обусловлено степенью проникновения в МК и связыванием с цит b558 в гетерогенной фазе. Фактически Gx-NH₂ в основном нейтрализует супероксиды, продуцированные супролом или изоформами цит b558, что вовсе не означает, что Gx-NH₂ является инактивирующим агентом этих цит b558, а просто обладает способностью нейтрализовать O₂⁻, тем самым проявляя антиоксидантный эффект и защищая цит b558 МК, так как эти супероксиды могут превращаться в перекись водорода и далее в HO·-радикалы, которые являются денатурирующими агентами для этих гемопротеинов [15-17]. В результате инкубирования Gx-NH₂ с МПА *in vitro* и *ex vivo* наблюдается увеличение метHb-восстанавливающей активности изоформ цит b558 в гетерогенной и особенно гомогенной фазе. Это свидетельствует о том, что эффективность Gx-NH₂ возрастает со степенью непосредственного связывания этого полипептида с указанными цит b558. Механизм увеличения метHb-восстанавливающей активности этих новых изоформ цит b558 может быть связан с эффектом улавливания O₂⁻ и соответственно с подавлением продуцирования HO·-радикалов, которые быстро деградируют и инактивируют эти гемопротеины. При этом антиоксидантный эффект Gx-NH₂ отражается на уровне МАА и МПА после инкубирования этого полипептида с кровью и МК указанных тканей (селезенка, костный мозг и тимус) *ex vivo*. На фоне снижения уровня цит b5 и сывороточных цит b558 наблюдается увеличение уровня МАА и остальных МПА (табл. 2). Действительно, *in vitro* у электрофоретически гомогенных МАА и МПА источники продуцирования O₂⁻ отсутствуют и нет возможности образования HO·, которые деградируют приведенные МАА. Механизм снижения уровня сывороточных цит b558, возможно, связан с тем, что *ex vivo* отпадает потребность синтеза сывороточных цит b558 адаптационными системами крови (в сыворотке крови активность каталазы невысокая, и перекись водорода нейтрализуется этими цитохромами), так как Gx-NH₂ уже снижает уровень этой перекиси путем улавливания O₂⁻ (перекись водорода образуется при дисмутировании супероксидов) [18]. Механизм снижения уровня цит b5 после *ex vivo* инкубирования Gx-NH₂ с кровью, возможно, связан с тем, что Gx-NH₂ увеличивает метHb-восстанавливающую активность цит b558III в ЭМ и других МК с соответственным снижением потребности метHb-редуктазы, для которой цит b5 является субстратом. Интересно то, что резко повышается уровень цит b558IV ЭМ (табл. 2). Видимо, улавливанием супероксидов Gx-NH₂ предотвращает денатурирование этого гемопротеина, очень чувствительного к воздействию перекиси водорода.

Таблица 1

Относительное изменение (%) активности МПА после их инкубирования с Gx-NH₂ *in vitro* и *ex vivo* по сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие Gx-NH₂), P>0.05, n=8

| Активность МПА | In vitro | Ex vivo |
|---|-----------|-----------|
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность супрола | -37.5±4.3 | -24.1±3.0 |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558III в гомогенной фазе | -10.9±1.4 | - |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558III в гетерогенной фазе | - | +25.8±3.1 |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKC в гомогенной фазе | +2.1±0.4 | - |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKC в гетерогенной фазе | - | -3.1±0.3 |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKKM в гомогенной фазе | -18.3±4.0 | - |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKKM в гетерогенной фазе | - | -14.9±2.3 |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKT в гомогенной фазе | -3.3±0.2 | - |
| O ₂ ⁻ -продуцирующая активность цит b558 MKT в гетерогенной фазе | - | -3.5±0.3 |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558III в гомогенной фазе | +12.4±2.3 | - |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558III в гетерогенной фазе | - | +19.5±3.2 |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKC в гомогенной фазе | +31.3±2.4 | - |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKC в гетерогенной фазе | - | +19.5±3.2 |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKKM в гомогенной фазе | +22.1±1.8 | - |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKKM в гетерогенной фазе | - | +18.3±2.6 |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKT в гомогенной фазе | +9.7±0.6 | - |
| МетHb-восстанавливающая активность цит b558 MKT в гетерогенной фазе | - | +5.7±0.4 |

Таким образом, амидирование БПП не приводит к его инактивированию, Gx-NH₂, т.е. амидированный БПП, оказывает в основном аналогичное с БПП-1 воздействие на МАА и МПА.

Можно заключить, что Gx-NH₂ обладает способностью улавливания супероксидов, продуцируемых супролом и новыми изоформами цит b558 ЭМ и МК селезенки, костного мозга и тимуса, предотвращая образование гидроксильных радикалов. Это приводит к стабилизации супрола, изоформ цит b558, с сохранением метHb-восстанавливающей активности последних, а также к предотвращению денатурации МАА и МПА. В целом эти изменения должны играть положительную роль для сохранения гемодинамики, кислородного гомеостаза и иммунитета организма.

Относительное изменение (%) уровня МАА и МПА после инкубирования крови, МКС, МККМ и МКТ в течение 5 дней при 4°C в присутствии 10 мкг/мл Gx-NH₂ ex vivo, по сравнению с 100% контрольными показателями (показатели в отсутствие Gx-NH₂), P<0.05, n=8

| МПА | % |
|--------------------|------------|
| Цит b5 | -41.3±4.1 |
| Цит b558 сыворотки | -12.3±1.7 |
| Цит b558III | + 13.3±1.9 |
| Цит b558 IV | + 93.4±6.1 |
| Цит b558 МКС | + 10.5±1.1 |
| Цит b558 МККМ | + 14.3±1.9 |
| Цит b558 МКТ | + 8.4±1.2 |
| Супрол | + 49.3±5.1 |
| ЦП | + 25.4±2.6 |
| ТФ | + 5.1±0.3 |
| Cu, Zn СОД | + 17.3±4.0 |
| Каталаза | + 5.5±0.2 |

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

Գ. Մ. Սիմոնյան, Գ. Ռ. Աղամյան, Մ. Ա. Սիմոնյան, ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան

ՊրոլիևոՎ հարուստ պոլիպեպտիդի ամիդացված անալոգի ազդեցությունը առնետների հյուսվածքների մետաղապրոտեինների մակարդակի և ակտիվության վրա in vitro և ex vivo

ՊրոլիևոՎ հարուստ պոլիպեպտիդի ամիդացված անալոգը (Gx-NH₂)՝ արյան, էրիթրոցիտային թաղանթների (էԹ) և իմունային համակարգի օրգանների (փայծախ, ոսկրածուծ, թիմուս) բջջաթաղանթների հետ ex vivo (5 օր) և դրանից անջատված մետաղապրոտեինների (ցիտիքրոմ (ցիտ) b558-ի իզոմերը), ինչպես նաև բարձր խտություն ունեցող շիճուկային լիպոպրոտեինի՝ սուպրոլի հետ in vitro (48 ժամ) +4°C-ում ինկուբացնելիս ցուցաբերում է այդ մետաղապրոտեինների կողմից արտադրված սուպերօքսիդ ռադիկալները (O₂⁻) որսալու ունակություն: Արդյունքում զգալիորեն նվազում է հիդրոքսիլ ռադիկալների (HO•) մակարդակը՝ հանգեցնելով սուպրոլի կայունության, ինչպես նաև ցիտ 558-երի՝ մետհեմոգլոբին վերականգնելու ակտիվության բարձրացմանը և հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների (Cu, Zn-ՍՕԴ, կատալազ, ցերուլոպլազմին) ակտիվության պահպանմանը: Ենթադրվում է, որ Gx-NH₂-ը դրանով ունենում է հակասթրեսային ազդեցություն՝ կարգավորելով թթվածնային հոմեոստազը և հեմոդինամիան:

G M. Simonyan, G. R. Aghamyan, M. A. Simonyan, academician A. A. Galoyan

Effect of Amidated Analogue of Proline-Rich Polypeptide on the Rat Tissues
Metalloproteins Level and Activity in vitro and ex vivo

The amidated analogue of proline-rich polypeptide (Gx-NH₂) possesses a superoxide-scavenging activity, which are generated by isoforms of cytochrome (cyt) b558 from erythrocytic membranes (EMs), cell membranes (CMs) of immune system organs (spleen, thymus, bone marrow), as well as from serum high density lipoprotein-suprol, after aerobic incubation with blood, EMs, CMs of these immune system organs ex vivo (5 days) and after aerobic incubation with metalloproteins (isoforms of cyt b558) prepared from these biosystems, as well as with serum high density lipoprotein-suprol, in vitro (48 h) at 4°C. As a result, the essentially decrease of the level of hydroxyl radicals (HO·) takes place, which causes the stabilization of suprol and increase of the methemoglobin-reducing activity of these cyt b558s, as well as the preservation of activities of antioxidative metalloproteins (Cu, Zn SOD, catalase, ceruloplasmin). Thus, Gx-NH₂ can play the antistressor role regulating the oxygen homeostasis and hemodynamics.

Литература

1. Galoyan A. A. Brain Neurosecretory cytokins: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic Plenum Publishers. N.-Y. 2004. 188 p.
2. Оксюзян Г. Р., Симонян М. А., Галоян А. А. – ДНАН Армении. 2003. Т. 103. N.2. С. 160-166.
3. Симонян Г. М., Нерсесян А. К., Симонян Р. М., Бабаян М. А., Симонян М. А., Галоян А. А. – Нейрохимия. 2005. Т. 22. N. 2. С. 125-130.
4. Ваградян А. Г., Галоян А. А., Агаджанов М. И., Симонян М. А., Зильфян А. В. – Нейрохимия. 2003. Т. 20. N. 4. С. 290-294.
5. Варданян А. Р., Симонян Р. М., Бабаян М. А., Геворкян Д. М., Симонян М. А. – Нейрохимия. 2004. Т. 21. N. 4. С. 289-292.
6. Knaryan V. H., Samanataray S., Galoyan A. A., Mohanakumar K. P. – Neuroscience Lett. 2005. V. 375. P. 187-191.
7. Simonyan M. A., Simonyan G. M., Simonyan R. M. – Electronic J. Natural Sciences. 2006. V. 2. N. 7. P. 3-6.
8. Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S. et al. – J. Biol. Chem. 2006. V. 281(6). P. 3660-3668.
9. Batot G., Paclet M. H., Doussiere J. et al. – Biochem. Biophys. Acta. 1998. V. 1406 (2). P. 188-202.
10. Kalinina N., Agrotis A., Tararak E. et al. – Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002. V. 22 (12). P. 2037-2043.

11. *Steinbeck M. J., Appel W. H., Verhoeven A. J., Karnovsky M. J.* – *J. Cell Biol.* 1994. V. 126 (3). P. 765-772.

12. *Galoyan A. A., Grigoryan S. L., Badalyan K. V.* – *Neurochem. Res.* 2006. V. 31 (6). P. 795-803.

13. *Симонян М. А., Симонян Г. М.* – Способ получения металлопротеинов крови. Лицензия изобрет. №341 Армпатента. Ереван. 1997.

14. *Симонян Г. М., Симонян М. А., Симонян Р. М.* – Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет. №908 Армпатента. Ереван. 2001.

15. *Fridovich J.* – *Annu. Rev. Biochem.* 1995. 64. 97-112.

16. *Aldazhov E.* – *Exp. Med. Morphol.* 1987. V. 26. P. 39-41.

17. *Симонян Г. М., Симонян Р. М., Симонян М. А.* В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. ЕГМУ им. М. Гераци. Ереван. 1999. С. 48-51.

18. *Симонян Г. М., Симонян Р. М., Симонян М. А.* – *Мед. наука Армении.* 2005. Т. 45. N2. С. 26-29.