

ФЕРРИГЕМОГЛОБИН ИНДУЦИРУЕТ РИЛИЗИНГ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ КЛЕТОК МОЗГОВОЙ ТКАНИ *ex vivo*: ПОДАВЛЕНИЕ ЭТОГО ПРОЦЕССА ГАЛАРМИНОМ

© 2013 г. Р. М. Симонян¹, К. А. Галоян², Г. М. Симонян¹, А. Р. Хачатрян¹,
М. А. Бабаян^{1,*}, Г. Р. Оксюзун³, М. А. Симонян¹

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

²University of Miami, Miller School of Medicine, Department of Orthopedics, Miami, Florida, USA

³ГПИ им. М. Налбандяна, Гюмри

На основании открытого недавно явления формирования нестабильного комплекса ферригемоглобина (ферриHb) с локализованной на клеточных мембранах NADPH оксидазой (Nox) был разработан простой, сравнительно нетрудоемкий, легко внедряемый и эффективный метод получения фракции Nox из мембран клеток мозговой ткани (МКМТ) крыс с использованием ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52. Впервые показано, что ферриHb (до 2×10^{-6} М) стимулирует (до 2 раз) релизинг Nox из МКМТ в растворимую фазу после 2 ч аэробной инкубации водной смеси этих мембран при 37°C и pH 8 *ex vivo*. Оптико-спектральные, кислотно-основные характеристики, а также NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности Nox из МКМТ практически не отличаются от таковых для Nox из мембран других типов клеток (селезенка, эритроциты, костный мозг и т.д.). В этих условиях синтетический аналог нейроактивного богатого пролином полипептида (БПП-1) из нейросекреторных гранул гипоталамуса – галармин (до 10 мкг) нелинейным образом подавляет релизинг Nox и стимулирует NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую и ферриHb-восстанавливающую активности Nox. Можно заключить, что индуцирование релизинга Nox из МКМТ ферригемоглобином является новым механизмом десенсибилизации этих мембран, а подавление галармином релизинга Nox и стимуляция NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей этой Nox – новым механизмом стабилизации МКМТ, а также иммуномодуляции и регуляции кислородного гомеостаза в мозговой ткани.

Ключевые слова: клетки мозговой ткани, NADPH оксидаза, ферригемоглобин, релизинг, галармин.

DOI: 10.7868/S102781331303014X

ВВЕДЕНИЕ

Изоформы NADPH оксидазы (Nox) играют ключевую роль в клеточных формированиях мозговой ткани при регуляции аэробных метаболических процессов с участием активных форм кислорода (АФК). При патологических состояниях различного характера наблюдается изменение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox с нарушением физиологического равновесия между анти- и прооксидантными системами. В результате этого наблюдается повышение уровня АФК, которые индуцируют оксидативное повреждение клеточных компонентов различного характера мозговой ткани,

включая мембраны этих клеток, для которых изоформы Nox (22 и 91 phox) являются структурно-функциональными компонентами, локализованными на поверхностных формированиях этих мембран [1, 2]. Повышение активности Nox может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний. Так, под влиянием липополисахарида (ЛПС) наблюдается повышение супероксид-продуцирующей активности иммунными клетками мозговой ткани – микроглии с повышением уровня NO. При этом антиоксиданты (N-ацетилцистеин) и ингибиторы Nox (дифенилениодониум) снижают повреждающее действие эффектов супероксидных радикалов (O_2^-) [3, 4]. Повышение активности Nox в микроглиях индуцирует хронический оксидативный стресс клеток гиппокампа и травматического повреждения

* Адресат для корреспонденции: 0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1, +374 10-28-18-32, e-mail: mbabayan@biochem.sci.am.

мозговой ткани, а ингибиторы Nox оказывают защитное действие [5, 6]. Nox вовлечены в глутатион и цинк-индуцированную допаминергическую нейродегенерацию [7], при этом препарат налоксон подавляет активность микроглии путем снижения уровня O_2^- непосредственным воздействием на изоформу Nox (gp 91 phox) [8]. В результате активации мембранной изоформы Nox (gp 91 phox) при ишемии наблюдается индуцирование нейронального повреждения [9], а в активированных микроглиях Nox стимулирует ЛПС-индуцированную нейротоксичность и экспрессию проинфламаторного гена [10]. Следовательно, в стратегии терапии приступа и нейродегенеративных заболеваний используются ингибиторы Nox [11, 12]. Эти результаты получены в большинстве с применением иммунофоретического Вестерн-блот метода при определении уровня Nox в клетках мозговой или других типов тканей [13]. Однако для установления новых механизмов стабилизации или дестабилизации нейрональных клеток необходимо разработать новый, более простой и сравнительно нетрудоемкий метод получения Nox из клеток мозговой ткани с учетом открытых недавно явлений высвобождения Nox из клеточных формирований и образования нестабильного комплекса между Nox и ферригемоглобином (ферриHb) [14, 15] в отсутствие и в присутствии синтетического аналога нейропептида из нейросекреторных гранул гипоталамуса галармина (БПП-1). Установление этих механизмов — цель данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения и очистки Nox (цитохрома b_{558}) из клеток мозговой ткани использовали целлюлозу DE-52 ("Whatman", Англия) и сефадекс G-100 ("Pharmacia", Швеция). Синтетический аналог богатого пролином полипептида из нейросекреторных гранул гипоталамуса галармин использовали для определения действия последнего на процесс рилизинга Nox из клеток мозговой ткани.

Для определения супероксид O_2^- -продуцирующей активности Nox были использованы нитротетразолиевый синий (НТС), феназин метасульфат (ФМС), пирофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH фирмы "Sigma" (США) для восстановления Nox — кристаллы дитионита натрия (Sigma).

ФерриHb-восстанавливающую активность определяли с электрофоретически гомогенным препаратом ферриHb, полученным из цитозоля эритроцитов белых крыс.

Для проведения ионообменной хроматографии и гель-фильтрации были использованы стеклянные колонки со стеклянными фильтрами раз-

мером 2×10 см и 3×80 см соответственно. Электрофорез проводили на 10% полиакриламидном геле, на приборе венгерского производства. Были использованы центрифуги K-24 и K-70 ("VEB MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf", Германия), а также термостат (Германия). Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 2000 (Япония) с длиной оптического пути, равной 1 см.

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с предварительным анализом на нормальность (Шапиро—Уилк) распределения выборок. Межгрупповые различия определяли методом параметрического анализа ANOVA, а парные линейные контрасты — при помощи теста Шеффе. Непараметрический анализ для множественных выборок с ненормальным распределением выполнен при помощи теста Краскала—Уолиса. Ранговый тест Манна—Уитни использовали для выявления различий между парными выборками.

Выделение фракции изоформ Nox (цитохрома b_{558}) из мембран клеток мозговой ткани. После взвешивания мозговой ткани (по 10 г) ее гомогенизировали в 100 мл 0.25 М сахарозе в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 2 мин при 4°C . Ядра клеток удаляли центрифугированием гомогената при 2000 об/мин в течение 10 мин. Митохондрии удаляли центрифугированием полученного надосадочного раствора при 12000 об/мин в течение 15 мин. Мембраны клеток мозговой ткани (МКМТ) осаждали центрифугированием полученного надосадочного раствора при 6000 об/мин при pH 5.6 в течение 20 мин. Далее осажденные МКМТ промывали водой (1 : 200 об/об) и повторно центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин). Очищенные от следов сахарозы и других сопутствующих водорастворимых солей и белков МКМТ смешивали с водой (1 : 10 об/об) и повторно гомогенизировали в аналогичном режиме. Далее pH гомогената доводили до 8 разбавленной щелочью. Пробы гомогената (по 20 мл) инкубировали в аэробных условиях при 37°C в течение 2 ч *ex vivo* в отсутствие ферриHb или галармина (контрольная группа проб — К), в присутствии 2×10^{-6} М ферриHb (пробы опытной группы-1, ОГ-1) и в присутствии 2×10^{-6} М ферриHb + 4 мкг галармина (ОГ-2), ферриHb и 8 мкг галармина (ОГ-3), ферриHb и 16 мкг галармина (ОГ-4).

Выделение и очистка Nox из проб ОГ-1-4. После центрифугирования приведенных проб при 14000 об/мин в течение 15 мин супернатанты разбавляли водой в 25–30 раз и осуществляли ионообменную хроматографию на отдельных колонках с целлюлозой DE-52, уравновешенной 0.004 М калий фосфатным буфером (КФБ). Сопутствующие белковые фракции удаляли элюи-

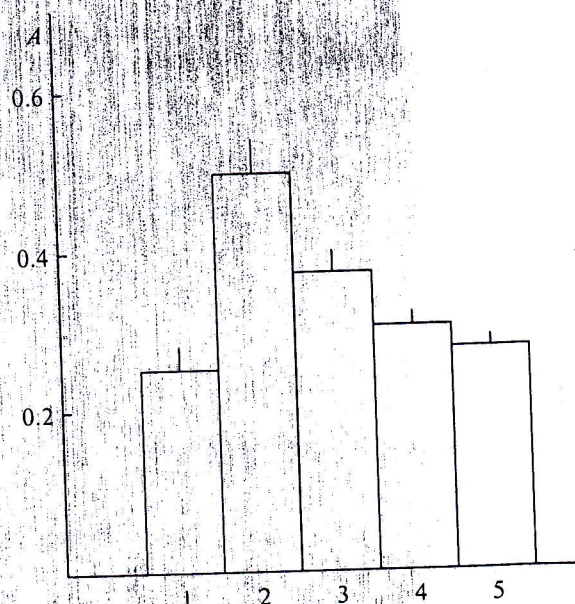


Рис. 2. Величина максимального оптического поглощения Nox при 530 нм (удельное содержание Nox, полученной из 1 г мозговой ткани крыс, с объемом фракции — 1 мл). Nox, выделенная из МКМТ после их инкубации в условиях, указанных в тексте (1), из МКМТ в присутствии: 2×10^{-6} М ферриHb (2), в присутствии: 2×10^{-6} М ферриHb + 2 мкг галармина (3), 2×10^{-6} М ферриHb + 6 мкг галармина (4) и 2×10^{-6} М ферриHb + 10 мкг галармина (5).

Ранее нами было показано, что ферриHb образует нестабильный комплекс с NO (в виде нитрозогемоглобина), локализованного в лигандном

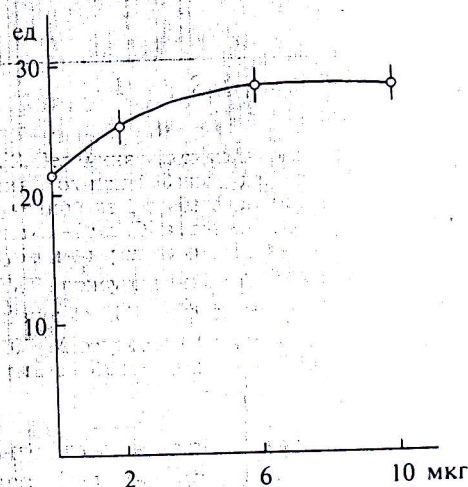


Рис. 3. Удельная NADPH зависимая O_2^- -продуцирующая активность Nox, полученной из МКМТ, после инкубации последних в условиях, указанных в тексте, в присутствии 2, 6 и 10 мкг галармина.

окружении железа гемовой группы Nox в эритроцитарных мембранах (ЭМ) [19–21] у больных при злокачественных новообразованиях (лимфобластический и миелобластический лейкоз у человека, саркома-45 у крыс, саркома-37 у мышей, асцитная карцина легких человека [21–24]). При указанных заболеваниях наблюдается снижение стабильности ЭМ, что создает благоприятные условия для проникновения гемоглобина в эти мембраны с образованием нестабильного комплекса с Nox, локализованной на этих мембранах. В результате этот комплекс попадает в растворимую (гомогенную) фазу и легко разрушается после ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (из этой колонки гемоглобин элюируется 0.2 М КФБ), из которой Nox элюируется 0.2 М КФБ. При аэробной инкубации МКМТ в приведенных условиях видимо имеют место нарушения стабильности этих мембран и образование комплекса ферриHb с Nox и выход этого комплекса в гомогенную фазу. Фактически такое повреждающее действие гемоглобина может наблюдаться при кровоизлиянии мозговой ткани. Нелинейное подавление галармином индуцированного ферригемоглобином рилизинга Nox из МКМТ может быть вызвано со стабилизацией этих мембран галармином, как это имело место при стабилизации ЭМ [25, 26]. С другой стороны, повышение NADPH-зависимой, O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей Nox из МКМТ может быть вызвано тем обстоятельством, что Nox из МКМТ является рецептором для галармина, как это имело место при Nox из клеток лимфосаркомы человека [26]. Путем улав-

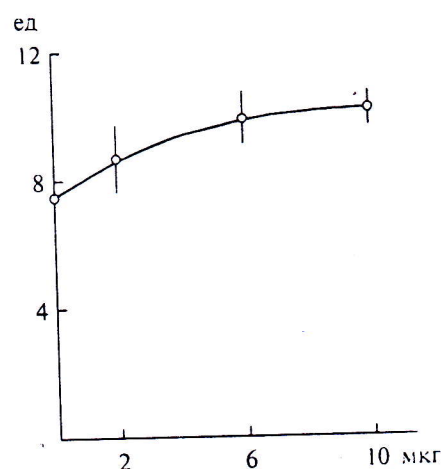


Рис. 4. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность Nox, полученной из МКМТ, после инкубации последних в условиях, указанных в тексте, в присутствии 2, 6 и 10 мкг галармина.

ливания высокотоксичных $\text{HO}^{\bullet}$ радикалов [27] галармин предотвращает дезактивацию Nox. Нелинейность действия галармина на активности Nox из МКМТ связана с эффектом насыщения галармином, так как места связывания галармина на определенном домене в молекуле Nox ограничены.

Можно заключить, что разработан новый метод получения Nox из МКМТ с использованием нового явления стимулирования ферригемоглобином релизинга Nox из этих мембран, что дает реальные предпосылки для внедрения этого метода в экспериментальную биохимию, нейробиологию и биомедицину. Выявлен новый механизм мембранодестабилизирующего действия ферригемоглобина и мембраностабилизирующего эффекта галармина, связанного с подавлением релизинга Nox из МКМТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. von Lohneysen K., Noack D., Wood M.R., Friedman J.S., Knaus U.G. // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 30. № 4. P. 961–975.
2. Glass M.J., Huang J., Oselkin M., Tarsitano M.J., Wang G., Ladecola C., Pickel V. // *Neuroscience*. 2006. V. 143. № 2. P. 547–564.
3. Lijia Z., Zhao S., Wang X., Wu C., Yang J. // *Neurochem. Int.* 2012. V. 61. № 7. P. 1220–1230.
4. Wu Y., Zhaj H., Wang Y., Li L., Wu J., Wang F., Sun S., Yao S., Shang Y. // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. № 8. P. 1690–1696.
5. Seo J.S., Park J.Y., Choi J., Kim T.K., Shin J.H., Lee J.K., Han P.L. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 28. P. 9690–9699.
6. Zhang Q.G., Laird M.D., Han D., Nauen K., Scott E., Dong Y., Dhandapani K.M., Brann D.W. // *PloS One*. 2012. V. 7. № 4. P. e34604–34510.
7. Kumar A., Singh B.K., Ahmad I., Shukla S., Patel D.K., Srivastava G., Kumar V., Pandey H.P., Singh C. // *Brain Res.* 2012. V. 1438. P. 48–64.
8. Wang Q., Zhou H., Gao H., Chen S.H., Chu C.H., Wilson B., Hong J.S. // *J. Neuroinflammation*. 2012. V. 9. P. 9–32.
9. Hur J., Lee B., Kim M.J., Kim Y., Cho Y.W. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391. № 3. P. 1526–1530.
10. Qin L., Liu Y., Wang T., Wei S.J., Block M.L., Wilson B., Liu B., Hong J.S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 1415–1421.
11. Hernández-Enríquez B., Guemez-Gamboa A., Morán J. // *J. Neurochem.* 2011. V. 117. № 4. P. 654–664.
12. Cairns B., Kim J.Y., Tang X.N., Yenari M.A. // *Curr. Drug Targets*. 2012. V. 13. № 2. P. 199–206.
13. Moon Y.M., Kang H.J., Cho J.S., Park I.H., Lee H.M. // *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2012. V. 159. № 4. P. 399–409.
14. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. // *Вопросы теорет. клин. мед.* 2012. Т. 15. № 4. С. 12–16.
15. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Секоян Э.С., Симонян М.А. // IV международная конференция “Современные методы реабилитации в медицине”. Армения. Ереван, 2009. С. 286.
16. Мелконян Л.Г., Симонян Р.М., Бабалян М.А., Хачатрян А.Р., Айрапетян Р.Л., Симонян Г.М., Давтян Т.К., Симонян М.А. // *Вопросы теорет. клин. мед.* 2011. Т. 14. № 3. С. 21–26.
17. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A. // *Electronic J. Natural Sci. NAS RA*. 2006. V. 2. № 7. P. 3–6.
18. Симонян М.А., Симонян Г.М., Симонян Р.М. Способ получения цитохромов *b* из мембран эритроцитов // Лицензия изобрет. № 908 Армпатента. Ереван. 2001.
19. Алексанян С.С., Симонян Г.М., Алексанян А.С., Степанян А.А., Бабалян М.А., Симонян М.А. // *Мед. наука Армении*. 2004. Т. XLIV. № 3. С. 47–50.
20. Karapetyan A.V., Simonyan G.M., Anne-Frances Miller, Bert Lynn Jr., Babayan M.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A. // 227th ACS National Meeting. Anaheim. CA. 2004. P. 135.
21. Симонян Г.М. // *Мед. наука Армении*. 2002. Т. XLII. № 2. С. 101–104.
22. Алексанян М.К., Галоян К.А., Симонян Г.М., Степанян Г.М., Симонян Р.М., Мурадян Р.Е., Алексанян С.С., Симонян М.А., Галоян А.А. // *Вопросы теорет. клин. мед.* 2010. Т. 13. № 2. С. 54–57.
23. Алексанян М.К., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Аракелян Л.Н., Алексанян С.С., Симонян М.А. // *Мед. наука Армении*. 2012. Т. LII. № 3. С. 23–35.
24. Алексанян М.К., Симонян Г.М., Алексанян С.С., Симонян Р.М., Ширинян В.С., Алексанян С.С., Симонян М.А., Степанян Г.М. // *Вопросы теорет. клин. мед.* 2012. Т. 15. № 1. С. 10–12.
25. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Агамян Г.Р., Симонян М.А., Галоян А.А. // *Вопросы теорет. клин. мед.* 2006. Т. 9. № 4. С. 26–30.
26. Simonyan G.M., Galoyan K.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A. // *Neurochem. Res.* 2011. V. 36. № 5. P. 739–745.
27. Tavadyan L.A., Galoyan K.A., Harutunyan L.A., Tonikyan G.H., Galoyan A.A. // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. № 6. P. 947–952.

Поступила в редакцию
25.03.2013 г.