

УДК 577.3

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ПЕПТИДОВ ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА¹

© 2006 Н.А. Кленова, Р.О.Кленов²

Изучены механизмы образования пептидных соединений в эритроцитах в условиях активации (действие адреналина), блокирования (действие обзидана) и частичного блокирования (совместное действие лиганда и антагониста). Выявлена зависимость скорости образования пептидов от состояния мембраны, адренорецепции и энергоресурсов эритроцитарных клеток. Условием активации примембранного комплекса протеаз является скорость производства цАМФ и АТФ.

Введение

Известно, что большинство биологически активных соединений имеет пептидную природу. В настоящее время обнаружено более 200 эндогенных пептидных соединений, образуемых в различных тканях животных, которые являются фрагментами цепей гемоглобина [1]. Функция гемоглобина как предшественника сигнальных молекул может быть сравнима по важности с ролью переносчика кислорода и представляет несомненный интерес.

В течение ряда лет были получены данные о наличии у эритроцитов эндокринной функции, связанной с внутриклеточными процессами расщепления гемоглобина и генерацией фрагментов в плазму. Образующиеся пептиды обладают широким спектром биологической активности – опиоидной, рилизинговой, антипролиферативной, эритропоэтиновой. По данным А.А. Карелина и соавторов [1], лизис гемоглобина осуществляется комплексом высокоспецифических протеаз, локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцита. Механизмы активации данного комплекса ферментов в настоящее время неизвестны. Можно предположить, что активация протеаз может осуществляться через фосфорилирование специфическими протеинкиназами, которые в свою очередь активируются цАМФ.

Включение аденилатциклазной системы сигнальными молекулами в таком случае будет сопровождаться увеличением производства пептидных соединений внутри эритроцитарных клеток. Целью исследования стало определение содер-

¹ Статья представлена доктором биологических наук профессором О.Н.Макуриной.

² Кленова Наталья Анатольевна (kln.ssu@rambler.ru), Кленов Роман Олегович, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

жания пептидов в ТХУ-экстрактах эритроцитов в условиях активации и блокирования β -адренорецепции.

Материалы и методы

Работа проводилась на эритроцитах донорской крови человека, предоставленной Областной станцией переливания крови. Объектом исследования служила чистая фракция эритроцитов человека, разделенная по возрасту на молодые и старые клетки [2]. Отмывку эритроцитов проводили 0,154 М холодным раствором NaCl при 600 G в течение 10 минут. Фракцию молодых эритроцитов помещали в среду Рингера-Локка в отношении 1:1. Добавляли растворы адреналина и обзидана в конечной концентрации 10 мкг/мл, что удовлетворяло условиям гиперадреналинемии. Эритроциты либо подвергали предварительной инкубации с сигнальными молекулами в термостате при 37°C в течение 20 мин., либо пробы сразу отмывали 0,154 М холодным раствором NaCl при 600 G однократно в течение 10 минут. Белки осаждали 10% ТХУ, добавляя к суспензии эритроцитов в отношении 1:2, и центрифугировали при 1000 G в течение 10 минут.

В 0,2 мл надосадочной жидкости (ТХУ-экстракта) каждой пробы определяли содержание пептидных соединений по методу Лоури, с добавлением 0,2 мл) 0,1М Na-фосфатного буфера (рН = 7,2) для нейтрализации излишней кислотности проб [3]. Измерение оптической плотности производили на спектрофотометре СФ-46.

Для статистической обработки результатов использовали критерий Фишера-Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение

Полученные нами ранее данные показали, что инкубация гетерогенной популяции эритроцитов в условиях активации и блокады адренорецепции не сопровождается достоверным увеличением количества пептидных соединений при активации аденилатциклазной системы. Мы предположили, что это связано с повреждением мембраны эритроцита и выходом части пептидных соединений в инкубационную среду. Вероятно также, что процесс генерации пептидов, как и производство цАМФ, определяется энергоресурсами клетки. Также на производство пептидных молекул внутри клетки могут оказывать влияние состояние мембраны эритроцита и длительность воздействия сигнальных молекул. Чтобы проверить эти предположения, мы определили содержание пептидных соединений во фракции молодых эритроцитов после инкубации с адреналином и обзиданом, а также без инкубации во фракциях клеток, различающихся по энергостатусу и состоянию мембран: молодых и старых.

Результаты инкубации в течение 20 минут фракции молодых эритроцитов в присутствии адреналина и обзидана не показали достоверных изменений в контрольной, адреналиновой и обзидановой пробах. Однако имелась выраженная

тенденция к повышению количества пептидов при активации адренорецепторов в присутствии адреналина и уменьшению их содержания в условиях блокады адренорецепторов обзиданом (табл.). При совместном инкубировании с адреналином и обзиданом пробы отличались достоверно ($p < 0,05$) более низким содержанием пептидных соединений по сравнению с контролем. Уменьшение составило около 20% от контрольной пробы.

Таблица

Содержание пептидных соединений в ТХУ-экстрактах фракций эритроцитов в условиях активации и блокады β -адренорецепции, мкг/мл

	Контроль	Адреналин	Обзидан	Адреналин + Обзидан
при инкубации (n=11)				
Фракция молодых эритроцитов	564,5 $\pm$ 19,6	513,6 $\pm$ 42,3	622,7 $\pm$ 44,3	452,7 $\pm$ 37,5*
без инкубации (n=6)				
Фракция молодых эритроцитов	196,3 $\pm$ 17,4	279,3 $\pm$ 16,5**	197,7 $\pm$ 26,1**	239,7 $\pm$ 25,9
Фракция старых эритроцитов	88,6 $\pm$ 10,1	96,3 $\pm$ 13,9	81,3 $\pm$ 19,9	95,6 $\pm$ 10,7

Примечание: * – достоверность различия $p < 0,05$; ** – достоверность различия $p < 0,01$.

Отсутствие достоверных различий в адреналиновых пробах можно объяснить повреждением мембраны эритроцита вследствие продолжительного действия адреналина. Взаимодействие этого гормона с β -адренорецептором сопровождается активацией фосфолипаз, увеличением ПОЛ, что приводит к росту проницаемости эритроцитарных мембран [6 – 9]. Проба инкубации в присутствии обзидана не имела достоверного увеличения концентрации пептидов, вероятно, из-за того, что обзидан не является лигандом рецептора и не проводит сигнала.

Исследования, проведенные без инкубации на клетках, различных по возрасту, также подтвердили возникшие предположения. Фракции молодых и старых эритроцитов, воздействие на которых сигнальных молекул длилось очень короткий промежуток времени, отличались достоверно ($p < 0,01$) более низким показателем содержания пептидных соединений по сравнению с клетками, подвергавшимися инкубации. Фракция молодых эритроцитов при воздействии адреналина имела достоверно более высокую концентрацию пептидных соединений (табл.). Процентное повышение составило более 40%. При блокировании β -адренорецепции обзиданом содержание пептидных соединений не отличалось от контрольной пробы. Это обусловлено, видимо, тем, что обзидан не активирует аденилатциклазу через адренорецептор. Совместное воздействие адреналина и

обзидана сопровождается только тенденцией к повышению содержания пептидных молекул. Вероятно, это объясняется эффективной конкуренцией обзидана за β -адренорецептор в первые мгновения действия лиганда и антагониста [10,11].

Фракция старых эритроцитов отличалась гораздо меньшим фоновым значением содержания пептидных молекул ($p < 0,01$). Возможно, это связано с ухудшением состояния эритроцитарных мембран и энергообеспечения клеток, вызванного возрастными изменениями в составе мембраны и в активности некоторых ферментов [9,16]. Вероятно, по этим причинам в пробах фракций старых эритроцитов не наблюдалось достоверных различий в содержании пептидных соединений. Однако в этих пробах присутствует сходная с фракцией молодых эритроцитов тенденция изменений.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы о механизмах генерации пептидных соединений в эритроцитах человека:

1. Активность примембранного комплекса протеаз определяется уровнем производства цАМФ, так как скорость генерации пептидных соединений в эритроцитах человека увеличивается в условиях активации адренорецепции.
2. Скорость генерации пептидных соединений зависит от состояния мембраны и энергоресурсов клетки (возраста клетки).
3. На генерацию пептидных соединений оказывает влияние время воздействия сигнальных молекул.

Литература

- [1] Карелин, А.А. Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов / А.А. Карелин, М.М. Филиппов, О.Н. Яцкин // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24. – № 4. – С. 271-281.
- [2] Варламова, С.В. Методы сепарации возрастных фракций эритроцитов / С.В. Варламова // Лаб. дело. – 1989. – № 9. – С. 32-35.
- [3] Большой спецпрактикум по биохимии / сост. Н.А. Кленова. – Самара: Изд-во: «Самарский университет», 1996. – 88 с.
- [4] Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум / Ю.П. Фролов. – Самара: Изд-во: «Самарский университет», 1997. – 266 с.
- [5] Борисенко, Г.М. Особенности β -адренергического рецептора при гипертонической болезни и спонтанной гипертензии у крыс / Г.М. Борисенко // Кардиология. – 1982. Т. XXII. – № 3. – С.120-125.
- [6] Исследование механизмов влияния температурного и химического факторов на функционирование биологических мембран / И.И. Выборнова [и др.] // Физиология человека. – 1997. – Т. 23. – № 1. – С.70-80.

- [7] Галактионов, С.Г. Пептиды группы «средних молекул» / С.Г. Галактионов, В.М. Цейтин, В.И. Леонова // Биоорганическая химия. – 1984. – Т.10. – №1. – С. 5-17.
- [8] Колобова, Е.В., Оценка β -адренореактивности эритроцитов у рожаящих женщин/ Е.В. Колобова, С.А. Дворянский, В.И. Циркин // Физиология человека. – 1998. – Т. 24. – №3. – С. 134-142.
- [9] Макшанова, Г.П. Изменение проницаемости эритроцитарных мембран и показателей липидного обмена у больных с политравмой при раннем и отсроченном оперативном лечении / Г.П. Макшанова, И.М. Устьянцева // Физиология человека. – 2003. – Т. 29. – №1. – С.95-99.
- [10] Мазур, Н.А. Основы клинической фармакологии и фармакотерапии в кардиологии / Н.А. Мазур. – М.: Медицина, 1988. – 304 с.
- [11] Перцева, М.Н. Мембранный комплекс гормон-рецептор-аденилатциклаза и его функциональное формирование в онтогенезе / М.Н. Перцева // Усп. совр. биологии. – 1982. – Т. 93. – Вып. 3. – С.382-396.

Поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 4/X/2006.

MECHANISMS OF PEPTIDES GENERATION BY ERYTHROCYTES OF A MAN³

© 2006 N.A.Klenova, R.O.Klenov⁴

In conditions of activation epinephrine receptors by an epinephrine the speed of peptides generation in erythrocytes of a man is enlarged, and blocking – the activity of the complex of proteases about the membrane is reduced, therefore, is defined(determined) by an output level cAMP. The speed of peptides generation also depends on a state of a diaphragm, power resources of a cell and time of signal molecules operation.

Paper received 25/IX/2006.
Paper accepted 4/X/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Makurina.

⁴ Klenova Nataliya Anatolievna (kln.ssu@rambler.ru), Klenov Roman Olegovich, Dept. of Biochmistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.