

УДК 577.122

## СОДЕРЖАНИЕ И СПЕКТР ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНЫХ ПЕПТИДОВ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦАМФ

© 2009 Р.О. Кленов

Самарский государственный университет, г. Самара

Поступила 27.01.2009

Установлено изменение спектра и количества внутриэритроцитарных пептидов в условиях действия эндогенного цАМФ на клетки разного возраста. Блокирование фосфодиэстеразы цАМФ в эритроцитах имидазолом приводит к повышению содержания пептидных соединений. Активация образования цАМФ адреналином приводит к появлению двух типов пептидов и увеличению их общего количества у молодых клеток.

*Ключевые слова:* эритроцит, цАМФ, пептидные соединения.

Многие биологически активные соединения имеют пептидную природу. Регуляция с помощью пептидных соединений является одной из самых сложных и многофункциональных систем регуляции в живых организмах. Изучение механизмов пептидной регуляции стало основой появления концепции существования в организме непрерывной совокупности регуляторных пептидов, обеспечивающих стимуляцию или подавление любых процессов жизнедеятельности [1]. Пути их регуляторных эффектов исследуются и анализируются, предлагаются физико-химические модели межмолекулярных взаимодействий пептидов с клетками, однако мало известны молекулярные механизмы их внутриклеточного производства. Существует гипотеза В.Т. Иванова о специфическом пептидном пуле, который происходит из функционально активных высокомолекулярных белков путем тканеспецифического ферментативного гидролиза этих белков до пептидов определенного размера [2]. Одним из таких белков-предшественников служит гемоглобин. Образующиеся из гемоглобина пептидные молекулы (более 200 типов) обладают широким спектром биологической активности – опиоидной, рилизинговой, антипролиферативной, эритропоэтиновой [3]. По данным А.А. Карелина и соавторов [3] лизис гемоглобина осуществляется комплексом высокоспецифических протеаз, локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцита. Механизмы активации данного комплекса ферментов в настоящее время неизвестны. Раскрытие механизма генерации пептидных соединений поможет не только понять природу этого процесса, но и позволит регулировать выработку биологически активных пептидов эритроцитами. Возможно, активация протеаз осуществляется через фосфорилирование специфическими протеинкиназами, которые в свою очередь активируются цАМФ. Включение аденилатциклазной системы сигнальными молекулами и ингибирование фосфодиэстеразы

цАМФ в этом случае будет сопровождаться увеличением производства пептидных соединений внутри эритроцитарных клеток и, возможно, изменением спектра генерируемых соединений.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на эритроцитах крови человека, предоставленной Самарской областной станцией переливания крови. Объектом исследования служила чистая фракция эритроцитов человека, разделенная по возрасту на молодые и старые клетки [4]. Чистоту фракций определяли, используя индекс фильтруемости эритроцитов [5], и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [6].

Фракции эритроцитов помещали в среду Рингера-Локка в отношении 1:1. Для изучения действия эндогенного цАМФ в пробы добавляли раствор адреналина в конечной концентрации 10 мкг/мл, превышающей физиологическую в 5-10 раз. В других пробах для блокирования фосфодиэстеразы цАМФ клетки инкубировали с имидазолом в концентрации 43 мкг/мл при 37<sup>0</sup>С в течение 10 мин. с 400 мкг/мл тритона. Кроме того, к инкубационным пробам, содержащим имидазол (43 мкг/мл) одновременно добавляли раствор адреналина (10 мкг/мл). Для прекращения действия сигнальных молекул, в пробы в двухкратном объеме добавлялся физиологический раствор и пробы центрифугировали при 600 g 10 мин. Затем супернатант убирали, а белки осаждали 10% ТХУ, добавляя к суспензии эритроцитов в отношении 1:2, и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. В надосадочной жидкости (ТХУ-экстракта) каждой пробы определяли содержание пептидных соединений по методу Лоури [7] и по УФ-поглощению ТХУ экстрактов (254 нм), с добавлением фосфатного буфера (рН 7,2) для нейтрализации излишней кислотности проб. Измерение оптической плотности производили на спектрофотометре СФ-46. 0,5 мл ТХУ-экстракта каждой пробы фракции эритроцитов после воздействия адреналина и имидазола совместно и поотдельности исследовали с помощью гель-хроматографии (колонка 8×190 мм, заполненная сефадексом G-10; 0,1М фосфатный буфер рН 6,86 в качестве подвижной фазы, скорость элюции 0,5

Кленов Роман Олегович, аспирант кафедры биохимии. Тел: 8-846-278-09-42 (раб.), 8-846-995-42-34 (дом.), 8-903-302-87-83 (сот.). e-mail: rklenov@yandex.ru

мл/мин). Детекцию проводили при длине волны 254 нм. Результаты выражали в усл.ед. - ОП×1000.

Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Верификация качества разделения эритроцитов на фракции молодых и старых клеток показала, что индекс фильтруемости во фракции старых эритроцитов отличался почти в два раза, а активность

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была ниже на 26-27%, что свидетельствовало о качественном разделении исходной популяции эритроцитов на фракции, содержащие преимущественно молодые и преимущественно старые клетки (табл. 1).

Действие высоких концентраций адреналина (10 мкг/мл) сопровождалось увеличением содержания пептидов внутри молодых клеток (мкг/мл) на 50% и увеличением УФ-поглощения на 23%. (табл. 2).

**Таблица 1. Индекс фильтруемости и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы молодых и старых эритроцитов человека**

Фракция эритроцитов	Индекс фильтруемости, %, n=15*	Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, Е**/эрит. в мл гемолизата, 25 <sup>0</sup> С, n= 7*	Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, Е**/эрит. в мл гемолизата, 37 <sup>0</sup> С, n= 7*
Молодые клетки	83,2±5,0***	1,278±0,032***	2,830±0,142***
Старые клетки	41,0±0,5	0,940±0,051	2,056±0,115

Примечание: \* - указано количество фракций, выделенных из крови разных доноров. \*\* - Е – международная единица активности ферментов. \*\*\* - достоверность различий p<0,01.

**Таблица 2. Содержание пептидных соединений и УФ-поглощение ТХУ-экстрактов фракций эритроцитов (n=10)**

Показатель	Фракция эритроцитов	Контроль	Адреналин (10 мкг/мл)	Имидазол (43 мкг/мл)	Адреналин+Имидазол
УФ-поглощение (у.е.)	Молодые клетки	400±16	492±10***	460±17*	535±14*
	Старые клетки	386±15	458±15**	474±15**	489±15***
Содержание пептидов (мкг/мл)	Молодые клетки	200±11	300±15***	260±14**	357±17*
	Старые клетки	220±14	234±16	250±12	285±12**

Примечание: \* – достоверность различия p<0,05; \*\* – достоверность различия p<0,01; \*\*\* – достоверность различия p<0,001.

Фракция старых эритроцитов в ответ на действие высоких концентраций адреналина не давала достоверного повышения содержания пептидов (мкг/мл), хотя регистрировалось увеличение УФ-поглощения проб на 19%. Возможно, это объясняется ухудшением метаболических процессов в клетках и нарушениями в мембранной рецепции [8].

Проведенные нами исследования хроматограмм пептидов, выделенных из эритроцитов с хроматограммами пептидов полученных инкубацией гемоглобина с пепсином доказывают гемоглибиновое происхождение эритроцитарных пептидных соединений [9,10]. Полученные данные позволили предполагать возможность активации процессов гидролитического расщепления гемоглобина цАМФ через цАМФ-зависимые протеинкиназы. Для увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ мы блокировали фосфодиэстеразу цАМФ имидазолом.

Повышение концентрации внутриклеточного цАМФ за счет блокирования фосфодиэстеразы цАМФ имидазолом (43 мкг/мл) сопровождалось как увеличением УФ-поглощения экстрактов эритроцитов, так и содержания пептидов, регистрируемых по методу Лоури. Во фракции молодых эритроцитов количество пептидов повышалось на 30%, а во фракции старых – на 14%.

Добавление к пробам, содержащим имидазол, раствора адреналина приводило к увеличению как содержания пептидных соединений, так и УФ-поглощения экстрактов. У молодых клеток содержание пептидов повышалось на 37% по сравнению с пробами, содержащими только имидазол и на 19% по сравнению с пробами, на которые воздействовали только адреналином (табл. 2).

Активация адренорецепции не только увеличивает производство пептидов внутри клеток, но и, как показали данные гель-хроматографии изменяет их спектр (рис.). При действии адреналина удается обнаружить дополнительный пик, который присутствует во всех пробах содержащих адреналин. Второй пик, характерный для всех проб, показал достоверное увеличение содержания пептидных соединений в пробах с повышенной внутриклеточной концентрацией цАМФ по сравнению с контрольными пробами (рис.).

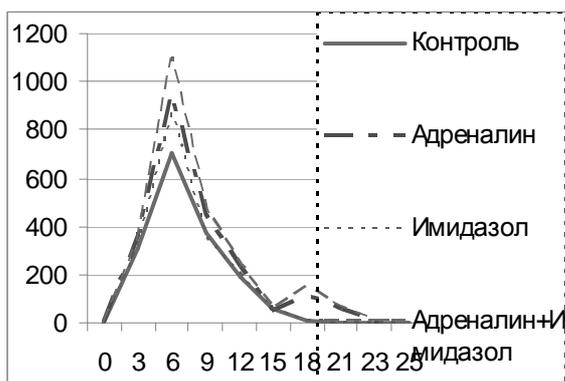


Рис. Гель-хроматография пептидных экстрактов фракции молодых эритроцитов (у.е.)

Если рассматривать спектр полученных пептидных соединений по массам, то в пробах, содержащих адреналин имелся дополнительный пик, свидетельствующий о наличии пептидных соединений предположительно массой 700–1000 Да, тогда как первый пик, представленный во всех пробах, вероятно, принадлежит пептидам массой от 1000 Да и выше.

Ускорение производства пептидных соединений эритроцитами в условиях активации адренорецепции, а также изменение их спектра, имеет важное регуляторное значение. Дальнейшее изучение этого явления, анализ спектра пептидов эритроцитов и их биологической активности представляет, на наш взгляд, существенный теоретический и практический интерес.

### ВЫВОДЫ

1. Повышение уровня эндогенного цАМФ в эритроцитах сопровождается увеличением количества пептидов и изменением их спектра при наличии гормонального сигнала. Эффект зависит от состояния мембранной рецепции и метаболических систем клетки, и обнаруживается только у молодых эритроцитов.

2. Увеличение эндогенного цАМФ за счет ингибирования фосфодиэстеразы цАМФ в отсутствие гормонального сигнала сопровождается повышением концентрации внутриэритроцитарных пептидов. Уровень повышения зависит от возраста клетки, у молодых клеток процент повышения больше.

3. Совместное воздействие на клетку гормонального сигнала с блокированием фосфодиэстеразы цАМФ приводит к суммированию эффекта – усилению повышения содержания пептидных соединений внутри эритроцитов и изменению их спектра.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы) Санкт-Петербург: Наука, 2003. 222 с.
2. Ivanov V.T., Karelin A.A., Philippova M.M. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool // Biopolimers (peptide Sci), 1997. V. 43, N2. P.171-188.
3. Филиппова М.М., Карелин А.А., Якуин О.Н. и др. Фрагменты функциональных белков в переживающей культуре эритроцитов человека // Биоорганическая химия. 2008. Т.34. №2. С.160-170.
4. Варламова С.В. Методы сепарации возрастных фракций эритроцитов // Лаб. дело. 1989. №9. С.32-35.
5. Tannert T.C., Lux K. Spreading of red cell blood suspensions on paper as simple test of cell deformability // Acta boil.med germ. 1981. P.739-742.
6. Beutler E. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency // Am.J.Clin. Pathol and Clin.med. 63(3). 1963. P.203.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin reagent// J..Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
8. Макианова Г.П., Устьянцева И.М. Изменение проницаемости эритроцитарных мембран и показателей липидного обмена у больных с политравмой при раннем и отсроченном оперативном лечении // Физиология человека. 2003. Т.29. №1. С.95-99.
9. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Механизм образования пептидных соединений в эритроцитах человека // Естественное знание и гуманизм. Томск. 2006. Т.3. №4. С.16-17.
10. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Механизмы генерации пептидов эритроцитами человека // Вест. СамГУ. Ест.науч. серия. Биология. №7 (47). 2006. С.75-79.

## THE CONCENTRATION AND SPECTRUM OF PEPTIDES INSIDE ERYTHROCYTES IN THE CONDITIONS OF INCREASING CAMP CONCENTRATION

© 2009 R.O. Klenov

Samara State University, Samara

Spectrum and quantity change of peptides inside erythrocytes in the conditions of action of internal cAMP on cells of different ages is established. The inhibition of phosphodiesterasis cAMP by imidazol leads to maintenance increase of peptide connections. Activation of cAMP generation by adrenaline leads to occurrence of two types of peptides and to increasing their concentration in young cells.

Key words: erythrocyte, cAMP, peptide connections.