

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ

© 2013 С.Г. Васильева, Е.П. Мочалова, А.В. Исаева, Н.А. Кленова¹

Обнаружено увеличение производства пептидных соединений эритроцитами человека при инкубации их в условиях гипергликемии (10 мМ/л) по сравнению с нормогликемией (5 мМ/л). При этом изменяется и спектр пептидных соединений, так как наблюдается изменение действия их на активность катепсина D лейкоцитов: в условиях нормогликемии выделяемые эритроцитами пептиды увеличивают активность катепсина D при дефиците кальция в среде, а в условиях гипергликемии, наоборот, ингибируют фермент в присутствии ионов кальция.

Ключевые слова: эритроциты, пептидные соединения, лейкоциты, протеолитическая активность.

Введение

Пептидная регуляция является одной из самых сложных и многофункциональных систем в живых организмах. Образование пептидов тканеспецифично и происходит в результате протеолитической деградации функционально важных клеточных белков: гемоглобина, актина и ряда ферментов [1–3]. Механизмы образования пептидных соединений в эритроцитах, закономерности их поступления в плазму крови и особенно их регуляторное действие остаются малоизучены. Исследованиями, проведенными ранее на кафедре биохимии СамГУ, было показано, что процесс образования пептидов в эритроцитах ускоряется под действием цАМФ и АТФ [4], снижается в условиях дефицита Ca^{2+} и Mg^{2+} [5], что позволяет предполагать участие в этом как протеасомных ферментов, так и каспаз. По-видимому, протеолитическая деградация гемоглобина и ряда других эритроцитарных белков может осуществляться и в физиологических условиях за счет протеасомных протеаз, и в условиях реализации эритроптоза, вызванного активацией неселективного кальциевого канала за счет каспазной активности. При этом спектр и количество регуляторных пептидных соединений могут значительно варьироваться. Реализация программы апоптозной гибели эритроцитов ускоряется

¹Васильева Софья Геннадьевна (sofia.vasiliewa@yandex.ru), Мочалова Екатерина Павловна (mochalova_ekaterina@lenta.ru), Исаева Анна Викторовна (antimo2008@rambler.ru), Кленова Наталья Анатольевна (klenova.ssu@yandex.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

в условиях гипергликемии, образование пептидных соединений, их спектр и биологическая активность при этом также могут изменяться. Поступающие в кровь пептиды могут оказывать непосредственное воздействие на лейкоциты, что может сказываться на их функциональной активности. В связи с распространением гипергликемических состояний: переизбыток, сахарный диабет — данные исследования являются актуальными как в фундаментальном, так и в научно-практическом отношении.

Целью данного исследования стало изучение процессов образования пептидов в эритроцитах человека в условиях гипергликемии и их влияния на протеолитическую активность лейкоцитов.

Материалы и методики

Фракции чистых эритроцитов и лейкоцитов получали из свежей донорской крови, предоставленной Самарской областной станцией переливания крови. Средний возраст доноров составил $27,5 \pm 7,4$ года. Отмывку эритроцитов осуществляли после удаления плазмы вместе с лейкоцитарной пленкой трехкратно холодным раствором PBS, центрифугируя в режиме 600g в течение 10 минут. Лейкоциты выделяли из отобранной плазмы. Плазму с взвешенными клетками центрифугировали в течение 10 минут при 2000 об/мин. Осадок, состоящий из лейкоцитов и примеси эритроцитов, обрабатывали раствором 0,89 %-ного NH_4Cl для разрушения эритроцитов и оставляли на 5 минут, после чего центрифугировали 3 минуты при 1000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости осадок лейкоцитов промывали 3–4 раза охлажденным PBS [6].

Эритроцитарные пептиды получали после инкубации фракции чистых эритроцитов в течение 60 минут при 37°C с раствором Рингера-Локка в соотношении 1:1 и периодическом осторожном перемешивании. Для создания дефицита Ca^{2+} в инкубационной среде использовали раствор Рингера-Локка без добавления CaCl_2 . Условия гипергликемии создавали добавлением 10 мМ глюкозы вместо стандартных 5 мМ в обычном растворе Рингера-Локка.

После инкубации пробы центрифугировали при 500g в течение 10 минут. В супернатанте определяли содержание пептидов по методу Лоури. Часть супернатанта смешивали с суспензией лейкоцитов в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C 10 минут. Контрольные пробы содержали вместо супернатанта среду Рингера-Локка (как с CaCl_2 , так и без). Содержание пептидов определяли также внутри эритроцитов после их депротенирования 10 %-ной ТХУ кислотой в соотношении 1:3. Степень гликозилированности белков мембран эритроцитов определяли с помощью метода, описанного Б.И. Фельдкореном с соавт. (1991) [7].

Для определения активности катепсина D в лейкоцитах и нейтральных протеаз в эритроцитах использовали модифицированный метод Ансона [8].

Результаты и их обсуждение

Определение количества пептидов в инкубационной среде и внутри эритроцитов показало, что в условиях гипергликемии содержание пептидных соединений в инкубационной среде достоверно возрастает, тогда как внутри эритроцитов наблюдается лишь тенденция к повышению в условиях инкубации в присутствии

ионов кальция (табл. 1). Возможно, что дефицит ионов кальция в инкубационной среде в условиях гипергликемии потенцирует данный процесс.

Известно, что условия гипергликемии сопровождаются неферментативным гликированием гемоглобина и мембранных белков эритроцитов [9], что может являться причиной возрастания содержания пептидов в инкубационной среде (табл. 1). Механизмы регуляции деградации гемоглобина в настоящее время не изучены, возможно, маркировкой для протеолитического расщепления может служить степень гликозилирования белка. При прохождении пептидных соединений через мембрану они укорачиваются, то есть подвергаются протеолитическому расщеплению [2].

Таблица 1

**Содержание пептидов в инкубационной среде и эритроцитах
в различных условиях инкубации, мкг/мл**

Условия инкубации	Инкубационная среда		Эритроциты	
	Рингера-Локка без CaCl ₂	Рингера-Локка, полный состав	Рингера-Локка без CaCl ₂	Рингера-Локка, полный состав
Нормогликемия, 5 мМ/л	66,7±4,6 n = 20	72,6±4,7 n = 20	109,0±10,6* n = 19	109,2±7,6* n = 17
Гипергликемия, 10 мМ/л	87,4±4,7** n = 22	86,7±4,5° n = 20	108,7±5,1* n = 17	115,6±6,3* n = 14

*P < 0,01 по отношению к инкубационной среде;

**P < 0,01 по отношению к нормогликемии;

°P < 0,05 по отношению к нормогликемии.

Отсутствие достоверного увеличения количества пептидов внутри клеток в условиях гипергликемии, возможно, связано с увеличением скорости их выхода из эритроцитов из-за повреждения мембран гликированием мембранных белков и образованием белковых агрегатов, повышающим проницаемость мембраны. Определение степени гликозилированности мембранных белков эритроцитов показало, что она увеличивается в условиях гипергликемии на 46–47 % (табл. 2).

Таблица 2

**Степень гликозилированности белков мембран эритроцитов (СГБ, у. е.)
и активность нейтральных протеаз (АНП, мкг/ мгНв в час)**

Показатель	Нормогликемия, 5 мМ/л		Гипергликемия, 10 мМ/л	
	без CaCl ₂	полный состав	без CaCl ₂	полный состав
СГБ, у.е. n = 10	38,1±4,9	40,4±5,6	56,0±5,7*	59,0±6,2*
АНП, мкг/мг Нв в час, n = 6	2,55±0,85	1,90±0,56	1,77±0,55	3,65±0,87

* P < 0,05 по отношению к нормогликемии.

Также можно отметить четко выраженную тенденцию к увеличению активности нейтральных протеаз в условиях гипергликемии и присутствия кальция в инкубационной среде, так как большинство данных ферментов кальцийзависимы.

Исследование активности катепсина D в лейкоцитах показало, что она снижается в условиях гипергликемии (табл. 3).

Таблица 3

**Активность катепсина D лейкоцитов после инкубации
с эритроцитарными пептидами**

Условия инкубации	Инкубация лейкоцитов с пептидами эритроцитов		Инкубация лейкоцитов без добавления пептидов	
	Среда без CaCl ₂	Среда с CaCl ₂	Среда без CaCl ₂	Среда с CaCl ₂
1. Нормогликемия, 5 мМ/л, n=8	5,44±0,44**	5,51±0,66	3,61±0,61	6,06±0,53
2. Гипергликемия, 10 мМ/л, n=8	0,89±0,19*	0,51±0,10**	0,76±0,12*	1,23±0,26*

*P < 0,01 по отношению к нормогликемии;

**P < 0,05 по отношению к пробам без пептидов.

Так как активность протеолитических ферментов является одним из показателей функционального состояния данных клеток [10], вероятно, гипергликемия способствует ухудшению функций лейкоцитов в этих условиях. Десятиминутная инкубация клеток с пептидами эритроцитов, выделенных в среду в условиях нормогликемии, выявляет повышение активности катепсина D в пробах, не содержащих кальция. Однако при гипергликемии наблюдается достоверное снижение активности в условиях присутствия ионов кальция. Так как в условиях гипергликемии мы наблюдали увеличение содержания пептидов в инкубационной среде (табл. 1), можно предположить, что в присутствии Ca²⁺ среди выделяемых пептидов появляются соединения, ингибирующие катепсин D, а в условиях нормогликемии в отсутствие Ca²⁺ в спектре выделяемых пептидов есть активирующие данный фермент.

Полученные данные вносят вклад в изучение механизмов производства пептидов эритроцитами человека и обнаружение их регуляторных свойств. Обнаруженное изменение количества и спектра пептидов в условиях гипергликемии, а также зависимость этого процесса от уровня ионов кальция позволяют предполагать важность изучения данных процессов, так как состояние гипергликемии сопровождается различными патологическими нарушениями как углеводного обмена, так и эндокринные заболевания. Влияние пептидных соединений на протеолитическую активность лейкоцитов указывает на важность спектра пептидных соединений, выделяемых эритроцитами, в реализации иммунных реакций организма человека.

Литература

- [1] Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). СПб.: Наука, 2003. 222 с.
- [2] Карелин А.А., Иванов В.Т. Пептидомика — новое направление постгеномных технологий // Вестник РАН. 2005. Т. 75. № 2. С. 139–156.
- [3] Фрагменты функциональных белков в переживающей культуре эритроцитов человека / М.М. Филипова [и др.] // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 160–170.

- [4] Кленов Р.О., Кленова Н.А. Действие цАМФ на образование пептидов в эритроцитах человека в зависимости от возраста клеток // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 149. № 6. С. 644–648.
- [5] Исаева А.В., Кленов Р.О., Кленова Н.А. Влияние дефицита кальция и магния на содержание пептидных соединений в эритроцитах человека при инкубации *in vitro* // Вестник СамГУ. Естественнонауч. серия. 2011. № 8(89). С. 179–183.
- [6] Шепотиновский В.И., Микашинович З.И. Диагностическая ценность определения активности гексокиназы в лейкоцитах больных ишемической болезнью сердца // Лаб. дело. 1979. № 11. С. 674–676.
- [7] Фельдкорен Б.И., Осипова Е.И., Коцедуб Т.П. Исследование параметров метода определения гликозилированных белков сыворотки крови // Лаб. дело. 1991. № 5. С. 56–58.
- [8] Лизосомы. Методы исследования / пер. с англ.; под ред. Дж. Дингла. М.: Мир, 1980. 344 с.
- [9] Голенок В.А., Ханькина И.В. Гликозилированные протеиды и реологические свойства эритроцитов при нарушениях углеводного обмена // Лаб. дело. 1988. № 2. С. 3–8.
- [10] Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2001. 288 с.

Поступила в редакцию 3/XI/2012;
в окончательном варианте — 3/XI/2012.

PRODUCTION OF PEPTIDE COMPOUNDS IN HUMAN ERYTHROCYTES AT HYPERGLYCEMIA AND THEIR EFFECT ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF LEUKOCYTE

© 2013 S.G. Vasiljeva, E.P. Mochalova, A.V. Isaeva, N.A. Klenova²

An increase in the production of peptide compounds in human erythrocytes incubated by them in conditions of hyperglycemia (10 mmol/L) compared with normoglycemia (5 mmol/L) is found. At that the spectrum of peptide compounds changes, since a change of their action on the activity of cathepsin D leukocytes: in normoglycemia allocated erythrocytes peptides increase the activity of cathepsin D with calcium deficiency in the environment, and in conditions of hyperglycemia, on the contrary inhibit the enzyme in the presence of calcium ions.

Key words: erythrocytes, peptide connections, leukocytes, proteolytic activity.

Paper received 3/XI/2012.

Paper accepted 3/XI/2012.

²Vasilieva Sofia Gennadyevna (sofia.vasiliewa@yandex.ru), Mochalova Ekaterina Pavlovna (mochalova_ekaterina@lenta.ru), Isaeva Anna Viktorovna (antimo2008@rambler.ru), Klenova Natalia Anatolyevna (klenova.ssu@yandex.ru), the Dept. of Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.