

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ИЗОФОРМЫ NADPH-ОКСИДАЗЫ БИОМЕМБРАН

¹Симомян Р.М., ²Саакян Л.Ю., ¹Симомян Г.М., ¹Симомян М.А., ²Секоян Э.С., ²Сагян А.С.

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

²Ереванский государственный университет

Введение. Согласно современным представлениям, в механизмах местноанестезирующего. противовоспалительного антимикробного действия препарата “Димексид” (диметилсульфоксид, “ДМСО”), существенная роль принадлежит его способности захватывать и связывать высокоактивные гидроксильные радикалы с плазматическими мембранами клеток, что сопровождается повышением их проницаемости [7,9,10,13,14], стабилизацией фосфолипидных компонентов мембран и снижением их текучести [11]. Не исключается, что в основе антимикробной активности ДМСО [5], может лежать его протекторное действие в отношении чувствительных к воздействию микроорганизмов изоформ NADPH-оксидаз (Nox). Установлено, что изоформы Nox, будучи локализованы в мембранах клеток, внутриклеточных компонентах и наночастицах – экзосомах млекопитающих, за счет продуцирования супероксидных радикалов (O_2^-) принимают участие в механизмах регуляции иммунной системы, экспрессии генов, митохондриального дыхания, кислородного гомеостаза, пролиферации и апоптоза [1,6]. Существенно, что являясь структурно-функциональным компонентом биомембран, Nox под влиянием гемоглобина подвергается отщеплению (*рилизингу*) [4] с развитием мембранных расстройств, в связи с чем, изыскание новых биоактивных соединений, ингибирующих рилизинг Nox из биомембран, является одной из приоритетных проблем современной биомедицины. С открытием явления нестабильного комплексообразования между гемоглобином и изоформами Nox важным шагом в этом направлении явилась разработка сравнительно щадящего метода выделения и очистки изоформ Nox без применения детергентов [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение протекторного действия ДМСО в отношении изоформ NADPH-оксидаз клеточных мембран.

Материал и методы исследований. В I-ой серии экспериментов Nox из мембран клеток печени, почек и легких беспородных белых (по 10 г) выделяли разработанным нами методом [3], путем инкубации срезов (размером около 0,25 см²) перфузионной ткани печени, почек и легких в присутствии 30 мкМ гемоглобина (ферриHb или ферроHb, который выделяли и очищали из гемолизата эритроцитов экспериментальных животных) в течение 2 ч при температуре 37°C и pH среды 7,4-8,0. После центрифугирования инкубационной смеси (при 10.000x g, 10 мин) супернатант разбавляли водой до 30 раз и осуществляли его ионообменную хроматографию на колонке с целлюлозой DE-52 (“Whatman”), из которой суммарную фракцию Nox элюировали 0,1М калий- фосфатным буфером, pH 7,4 (КФБ). Удельное содержание изоформ Nox было определено в расчете на 1 г ткани и на 1 мл Nox.

Во II-ой серии экспериментов осуществляли аэробную инкубацию растворов изоформ Nox (4 мл, по 2-2,5 мг/мл, растворенной в 0,1 КФБ) с 2% ДМСО и без него *in vitro* при температуре 22–24°C в течение 20 дней.

В III-ей серии экспериментов осуществляли аэробную инкубацию 3% р-ра ДМСО со срезами перфузионной ткани печени и почек в водной среде в присутствии 30 μM гемоглобина в течение 2 ч при 37°C при pH 7,4-8,0 и изоформы Nox выделяли вышеприведенным способом.

NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли нитротетразолиевым синим методом (НТС) путем вычисления процента стимулирования образования формазана при 560 нм в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности Nox принимали количество белка, которое стимулирует образование формазана на 50%. Удельную супероксид-продуцирующую активность Nox определяли в расчете на 1 г ткани [1].

ФерриHb-восстанавливающую активность изоформ Nox определяли, используя ферриHb с величиной плотности максимального оптического поглощения (*при 565 нм*) равной 0,8. В кварцевых кюветах спектрофотометра к 2,5 мл раствора ферриHb добавляли 0,2 мл Nox с плотностью максимального оптического поглощения при 530 нм (A_{530}) равной 0,3. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 3-4 ч при 30°C. Далее после повторного перемешивания реакционной смеси определяли кинетику восстановления ферриHb до ферроHb путем измерения снижения плотности α -полосы поглощения ферриHb (подобное снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферроHb, который имеет максимальное поглощение при 555 нм). За единицу ферриHb-восстанавливающей активности Nox принимали количество белка, вызывающего снижение плотности максимального оптического поглощения α -полосы ферриHb до 0,05 в течение часа при 30°C. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность Nox была определена в расчете на 1 г ткани, 1 мл эритроцитов и 1 мл сыворотки. СОД-миметическую активность ДМСО определяли нитротетразолиевым синим методом. Оптические спектры регистрировали на спектрофотометре "Hitachi 2000" с оптическим пробегом 1 см. Статистическую значимость различий определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов из мембран клеток срезов тканей (легкие, печень и почки) осуществляли выделение изоформ Nox. Установлено, что в результате образования нестабильного комплекса между гемоглобином и Nox и перехода указанного комплекса в гомогенную фазу (в раствор) наблюдается отщепление изоформ Nox из мембран клеток срезов. После расщепления данного комплекса при ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 изоформы Nox отделяются от гемоглобина. Отщепленные изоформы Nox имеют характерную структуру и интенсивность оптических спектров поглощения. В окисленном состоянии наблюдаются максимальные поглощения при 560 нм (*α -полоса поглощения*), 530 нм (*β -полоса поглощения*) и 412 нм (*γ -полоса поглощения или поглощение Core*). После восстановления дитионитом натрия, максимальные оптические поглощения появляются при 558 нм, что характерно лишь для Nox клеток млекопитающих [8], 525 нм и 418 нм соответственно (*рис. 1*).

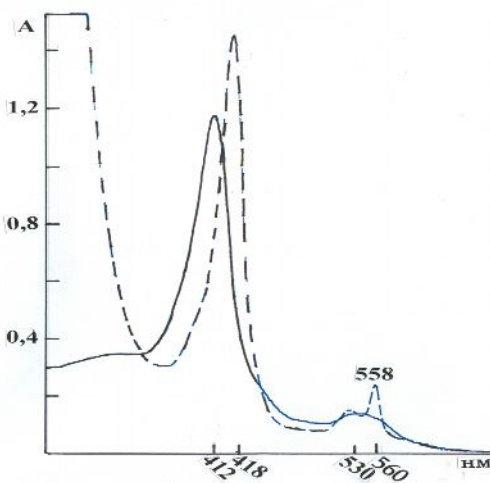


Рис.1. Оптические спектры поглощения изоформ Nox из срезов ткани легких, печени и почек крыс (на примере Nox из срезов легких) в окисленном состоянии. (-) и после восстановления дитионитом натрия (----). Изоформы Nox растворены в 0,1 М КФБ.

Расчетная плотность максимального оптического поглощения при 530 нм 1 мл Nox, отщепленной из мембран срезов 1 г ткани легких, печени и почек, составляет 0,54 оптических единиц (ое), 0,42 ое и 0,36 ое соответственно.

Во второй серии экспериментов в результате аэробной инкубации отщепленных изоформ Nox из мембран срезов тканей легких, печени и почек в приведенных условиях (при 22-24°C) без добавления ДМСО *in vitro* уже через 2-3 дня наблюдается некоторое помутнение раствора изоформ Nox и их денатурирование с изменением формы оптического спектра данного фермента. Процесс усиливается при увеличении срока инкубации, и практически полное необратимое денатурирование изоформ Nox наблюдается на 18-20 день аэробной инкубации. В присутствии 2% ДМСО (эффективная концентрация 2-3%) помутнение или обесцвечивание растворов Nox и изменение характерных форм оптического спектра их поглощения практически не наблюдается (рис.2, а,б,в).

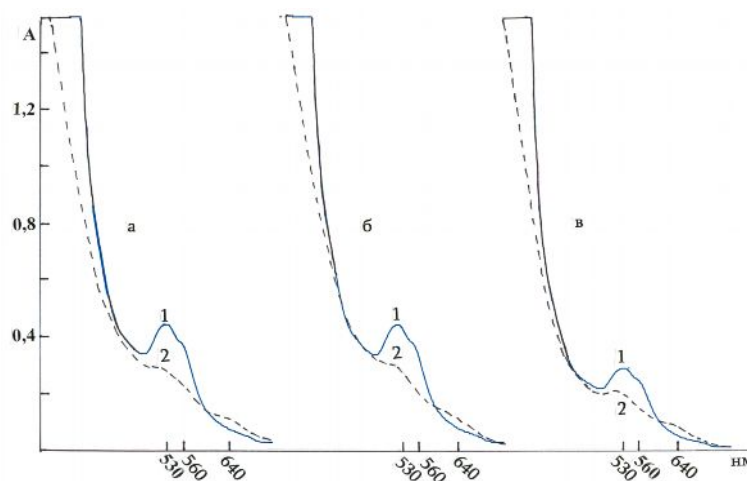


Рис.2. Оптические спектры поглощения изоформ Nox, выделенных из тканевых срезов после их аэробной инкубации в присутствии 2% ДМСО (1) и без ДМСО (2) в течение 18-20 дней при 22-24°C *in vitro* после центрифугирования растворов. *Обозначения:* тканевые срезы а- легких, б – печени, в- почек.

В используемой концентрации ДМСО практически не приводит к изменению характерных форм и интенсивности оптических спектров поглощения Nox, в частности при 530 нм (*β-полоса поглощения*). Существенно, что указанные изменения носят необратимый характер, при этом, степень денатурации изоформ Nox из печени, почек и легких практически не отличается. После устранения мутности растворов центрифугированием (при 12.000xg, 10 мин) изоформ Nox из срезов мембран клеток печени, почек и легких с ДМСО и без него были определены NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности изоформ Nox. Удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность изоформ Nox из мембран клеток печени, почек и легких после аэробной инкубации указанных ферментов в течение 18-20 дней в присутствии 2% ДМСО *in vitro* практически не изменялась (снижалась в среднем на 4-5%), между тем как в отсутствие ДМСО она снижалась в среднем на 75-80% (рис.3).

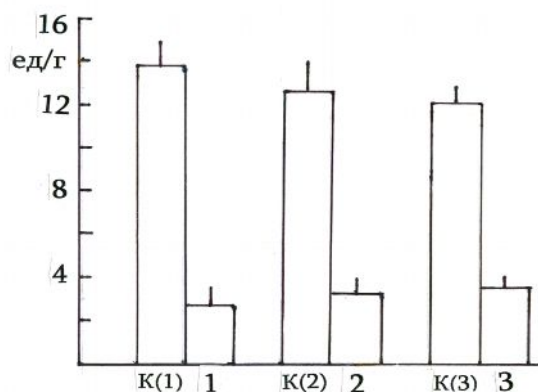


Рис.3. Удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность изоформ Nox, отщепленных из мембран клеток тканей легких (К1), почек (К2) и печени (К3) в присутствии 2% ДМСО и без него (1,2,3) соответственно ($P = 0,003; 0,001$ и $0,001, n=6$).

Практически аналогичная динамика наблюдается в изменениях ферриНб-восстанавливающей активности исследуемых Nox при наличии и без ДМСО, при этом СОД-миметическая активность ДМСО составляла всего 8,2 ед/мл. В третьей серии экспериментов в результате инкубации срезов перфузионной ткани в приведенных условиях в присутствии 2% ДМСО *ex vivo* наблюдается снижение уровня отщепленных изоформ Nox из мембран поверхностных клеток срезов легких на $26,6 \pm 4,0\%$ ($P=0,002$, $n=6$), почек на $36,4 \pm 4,8\%$ ($P=0,005$, $n=6$) и печени на $55,2 \pm 6,1\%$ ($P=0,01$, $n=6$) по сравнению с показателями Nox, полученными без ДМСО (рис.4).

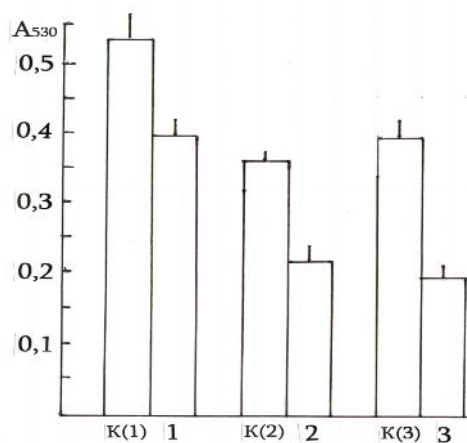


Рис.4. Расчетная плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) отщепленных изоформ Nox из мембран клеток срезов тканей легких (К1), почек (К2) и печени (К3) в отсутствии ДМСО и снижение этих показателей под влиянием 3% ДМСО после инкубации со срезами тканей *ex vivo* (1,2,3) при pH 7,4-8, 37°C в течение 2 ч ($P=0,001$; $0,005$ и $0,01$, $n=6$).

На основании результатов проведенного исследования можно заключить, что выявленные изменения оптико-спектральных показателей и активностей изоформ Nox из мембран печени, почек и легких (растворенных в 0,1 М КФБ) при их аэробной инкубации *in vitro* в отсутствие ДМСО связаны с воздействием микроорганизмов [12]. В результате указанного воздействия наблюдается необратимое изменение гемовой группы исследуемых гемопротеинов, характеризующееся их обесцвечиванием, снижением интенсивности поглощения при 412 нм (поглощение *Soret*) с изменением характерной формы оптического спектра поглощения и помутнением растворов исследуемых ферментов. При этом появляется новый максимум поглощения при 575 нм, что свойственно денатурированным формам Nox. Из-за потери нативности изоформ Nox практически в одинаковой степени наблюдается снижение или отсутствие NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активностей исследуемых ферментов. В аналогичных условиях ДМСО (2%) практически полностью оказывает антимикробное воздействие, сохраняя нативность указанных ферментов с предотвращением их дезактивации *in vitro*. Повышение уровня изоформ Nox, отщепленных из

клеточных мембран срезов тканей в приведенных условиях и при отсутствии ДМСО, как и его снижение в присутствии ДМСО, возможно связано с антиоксидантной активностью ДМСО и захватом $\text{NO}\cdot$ -радикалов, а также $\text{O}_2\cdot^-$ – активных форм кислорода, инициирующих в биомембранах процессы липидной пероксидации [16], при этом первая фаза отщепления Nox из биомембран связана с повышением уровня перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот. Следовательно, установлено, что путем захвата свободных радикалов и ингибирования процессов липидной пероксидации ДМСО повышает мембранную проницаемость, что способствует проникновению гемоглобина в мембраны и формированию нестабильного комплекса с локализованными в них (*или на их поверхности*) Nox [15], с переходом последних из гетерогенной фазы (*из мембран*) в гомогенную фазу (*в раствор*) [2].

Принимая во внимание, что снижение уровня изоформ Nox в биомембранах, реализуемое путем их отщепления гемоглобином, сопровождается нарушением мембранных функций за счет повреждающего действия внеэритроцитарного гемоглобина на мембранные структуры [17], результаты проведенного исследования можно рассматривать в качестве концептуально нового подхода к изучению феномена нестабильного комплексообразования гемоглобина с изоформами Nox , локализованными в биомембранах. На основании полученных данных, сформулированы следующие научные положения:

- впервые из биомембран выделены и идентифицированы изоформы Nox с характерными оптическими спектральными показателями и активностью;
- выявлено, что процесс отщепления изоформ Nox обратно пропорционален уровню антирадикального потенциала, который в исследуемых тканях распределен следующим образом: печень > почки > легкие;
- установлена способность ДМСО подавлять процесс рилинга изоформ Nox из мембран клеток срезов тканей и, тем самым, проявлять мембраностабилизирующее действие, обусловленное его антиоксидантным эффектом;
- показано, что одним из механизмов антимикробной активности ДМСО является его способность сохранять нативные свойства изоформ Nox , выделенных из мембран клеток тканевых срезов при их аэробной инкубации в условиях *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелконян Л.Г., Симонян Р.М., Бабаян М.А., Хачатрян А.Р., Айрапетян Р.Л., Симонян Г.М., Давтян Т.К., Симонян М.А. Изменение проинфламаторными цитокинами оптических спектральных свойств супероксид продуцирующей и ферригемоглобин-восстанавливающей активностей изоформ NADPH-оксидазы крыс *in vitro*. //Вопр. теорет. клин. мед. 2011. 14(3). С. 21-26.
2. Симонян Р.М., Галоян К.А., Симонян Г.М., Хачатрян А.Р., Бабаян М.А., Оксюзян Г.Р., Симонян М.А. Ферригемоглобин индуцирует релизинг NADPH-оксидазы из клеток мозговой ткани *ex vivo*: подавления этого процесса галармином. // Нейрохимия, 2013. Т.30, №3. С.1-5.
3. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А. Способ выделения изоформ NADPH-оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
4. Фесчан С.М. Стимуляция ферригемоглобином релизинга изоформ NADPH-оксидазы из сыворотки крови и мембран субклеточных формирований кардиомиоцитов крыс и подавление этого процесса α -токоферолом и L-аргинином *ex vivo*. //Медицина, наука и образование, 2013. №14. С.96-102.
5. Ansel H.C., Norred W.P., Roth I.L. Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide *against* Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Bacillus megaterium.// J. Pharmaceutical Sciences. 1969. Vol.58. P.836-839.
6. Chuong Nguyen M.V., Lardy B. et al. NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family. //Med. Sci. (Paris). 2015. Vol.31. P.43-52.
7. Drummond G.R., Cai H, Davis M.E. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. //Circ Res. 2000. Vol.86. P.347-354.
8. Gorudko I.V., Mukhortava A.V., Caraher B. et al. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. //Arch. Biochem. Biophys. 2011. Vol.516. P.173-181.
9. Hazen K.C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing *in vitro*.//Microbiol. Infect. Dis. 2013. Vol.75. P.60-63.
10. Ikeda Y., Long D.M. Comparative Effects of Direct and Indirect Hydroxyl Radical Scavengers on Traumatic Brain Oedema. //Acta Neurochirurgica. 1990. Vol.51, P.74-76.
11. Lyman G.H., Papahadjopoulos D, Preisler H.D. Phospholipid membrane stabilization by dimethylsulfoxide and other inducers of Friend leukemic cell differentiation. //Biochim. Biophys. Acta. 1976. Vol.448. P.460-473.
12. Mackiewicz B, Skórska C, Dutkiewicz J. Relationship between concentrations of microbiological agents in the air of agricultural settings and occurrence of work-related symptoms in exposed persons. //Ann. Agric. Environ. Med. 2015. Vol.22. P.473-477.
13. Марк J.B., Ronald P.M. Physiology/Pharmacology Direct evidence for *in vivo* hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: An ESR spin-trapping investigation (iron poisoning/free radicals/iron autoxidation. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol.88. P. 8440-8444.
14. Mir A.S., Bhat A.A. New Fenton assay for Hydroxyl radical scavengers by monitoring Catechol oxidation. // International Journal of PharmTech Research CODEN (USA). 2014 A, Vol.6. P.759-768.
15. Morré DM, Guo F, Morré DJ. An aging-related cell surface NADH oxidase (arNOX) generates superoxide and is inhibited by coenzyme Q. //Mol. Cell. Biochem. 2003. Vol.254. P.101-109.
16. Mylonas C., Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. //In Vivo. 1999. Vol.13. P.295-309.
17. Ushio-Fukai M. –Localizing NADPH oxidase-derived ROS. //Sci. STKE, 2006, Vol.2006(349), P. re8.

ԴԻՄԵԹԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴԻ ՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ NADPH-ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԻԶՈՁԵՎԵՐԻ ՎՐԱ

Միմոնյան Ռ.Մ., Սահակյան Լ.Յու., Միմոնյան Գ.Մ., Միմոնյան Մ.Ա., Սեկոյան Է.Ս., Սաղյան Ա. Ս.
Համաձայն ժամանակակից պատկերացումների, կենսաթաղանթներում NADPH-օքսիդազի (Nox) իզոմերների մակարդակի իջեցումը, որն իրականանում է հեմոգլոբինով վերջիններիս արտազատմամբ, ուղեկցվում է թաղանթային գործընթացների խանգարմամբ, ի հաշիվ արտաերիթրոցիտային հեմոգլոբինի վնասակար ազդեցության թաղանթային գոյացությունների վրա. Իրականացված հետազոտության արդյունքները հանդիսանում են կենսաթաղանթներում տեղակայված Nox-ի իզոմերների միջև անկայուն կոմպլեքսագոյացման ֆենոմենի մասին պատկերացումների զարգացման մոտեցումներից մեկը: Առաջին անգամ կենսաթաղանթներից անջատվել և նույնականացվել են բնութագրական օպտիկական սպեկտրալ ցուցանիշներով և ակտիվությամբ Nox-ի իզոմերը, բացահայտվել է, որ Nox-ի իզոմերների անջատումը հակառակ համեմատական է հակառադիկալային պոտենցիալի մակարդակին, որը հետազոտվող հյուսվածքներում բաշխված է հետևյալ կերպ. լյարդ>երիկամներ>թոքեր: Հաստատվել է, որ դիմեթիլսուլֆօքսիդը (ԴՄՍՕ) ընդունակ է ճնշելու Nox-ի իզոմերների ռիլիզինգի գործընթացը հյուսվածքային հատվածքների բջջաթաղանթներից, և այդպիսով ցուցաբերել թաղանթակայունացնող ազդեցություն՝ պայմանավորված նրա հակաօքսիդանտային էֆեկտով: Ցույց է տրված, որ ԴՄՍՕ-ի հակամանրէային ակտիվության մեխանիզմներից մեկը հանդիսանում է *in vitro* աերոբ ինկուբացման պայմաններում հյուսվածքային հատվածքների բջջաթաղանթներից անջատված Nox-ի իզոմերների բնական հատկությունների պահպանման նրա ունակությունը:

PROTECTIVE EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE ON ISOFORMS OF ADPH-OXIDASE BIOMEMBRANS

Simonyan R.M., Sahakyan L.Yu., Simonyan G.M., Simonyan M.A., Sekoyan E.S., Saghyan A.S.

According to modern representations, a decrease in the level of NADPH-oxidase (Nox) isoforms in the biomembranes realized by their release by hemoglobin is followed by malfunction of membrane functions due to the damaging effect of extraerythrocytic hemoglobin on membrane structures. Investigation result is one of the approaches to the development of modern ideas on a phenomenon of unstable complex formation between Nox isoforms localized in biomembranes. Nox isoforms with characteristic optical spectral values and activities are allocated and identified from biomembranes for the first time, it is revealed that process of Nox isoforms release is inversely proportional to the level of anti-radical potential which is distributed in the investigated tissues as follows: liver> kidneys> lungs. There is established an ability of dimethylsulfoxide (DMSO) to suppress process of Nox isoforms release from the membranes of cells of tissue sections and, thereby show the membrane stabilizing action due to its antioxidant effect. It is shown that one of the mechanisms of DMSO antimicrobial activity is its ability to maintain native properties of Nox isoforms allocated from the membranes of cells of tissue sections during aerobic incubation in *in vitro* conditions.