

УДК 616.12:575.113.2+577.152.1

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА АКТИВНОСТЬ ОЧИЩЕННЫХ 20S, 26S ПРОТЕАСОМ И ПРОТЕАСОМНУЮ АКТИВНОСТЬ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ

В.Е. Досенко, В.С. Нагибин, Л.В. Тумановская, В.Ю. Загорий, А.А. Мойбенко

Институт физиологии им. А.А.Богомольца Национальной академии наук
Украины, отдел экспериментальной кардиологии
Украина, Киев 01024, ул. Богомольца, 4; тел.: 38044256-24-81;
эл. почта: dosenko@biph.kiev.ua

Кверцетин *in vitro* дозозависимо подавляет все три пептидазные активности очищенной 20S протеасомы, причём степень подавления сопоставима с таковым у специфического ингибитора протеасомы. В наибольшей степени кверцетин подавляет химотрипсиноподобную активность 20S протеасомы. Аналогичным образом кверцетин ингибирует активность 26S протеасомы из протеасомной фракции (PF II). При определении активности протеасомы в изолированных кардиомиоцитах показано, что кверцетин на 26% ($p = 0,03$) подавлял трипсиноподобную протеасомную активность, на 63.7% ($p = 0,04$) - химотрипсиноподобную и на 34,2% ($p = 0,16$) - пептидилглютамил пептидгидролазную. Кверцетин и его водорастворимый аналог корвитин оказывают принципиально такое же действие на кардиомиоциты, что и специфический ингибитор протеасомы класто-лактацин-β-лактон. В концентрации 5 и 10 мкМ кверцетин и корвитин вызывали снижение количества живых кардиомиоцитов, увеличивая при этом количество некротических и апоптотических клеток. В концентрации 2,5 мкМ кверцетин и корвитин в значительной степени нивелировали повреждающее действие аноксии-реоксигенации на кардиомиоциты, уменьшая количество некротических и апоптотических клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы кардиопротекторного действия кверцетина могут быть связаны с подавлением активности протеасомы.

Ключевые слова: протеасома, кверцетин, кардиомиоциты, аноксия-реоксигенация.

ВВЕДЕНИЕ. Изучению механизмов действия биофлавоноидов посвящено много работ. Относительно кверцетина, как одного из наиболее распространенных, содержащихся в достаточном количестве в продуктах питания полифенолов, установлено наличие широкого спектра биологических мишеней. Кроме антиоксидантных свойств, кверцетин проявляет себя как ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы, аденилатциклазы, липоксигеназы и множества протеинкиназ [1-7]. В последние годы влияние кверцетина на последнюю группу ферментов привлекает особое внимание исследователей. Английские ученые, проанализировав эффект кверцетина и 14-ти других ингибиторов на активность 25 очищенных протеинкиназ, показали, что кверцетин в концентрации 20 мкМ вызывает существенное снижение активности 16 из них, а на четыре оказывает противоположный эффект [6]. Одним из наиболее важных механизмов действия кверцетина считается его способность предупреждать экспрессию белков теплового шока (HSP), причём в данном случае кверцетин оказывает свое действие за счёт предупреждения связывания фактора теплового шока с соответствующим элементом в промоторе генов HSP [8]. Этими и другими данными относительно

механизмов действия кверцетина многие авторы объясняют тот или другой биологический эффект этого биофлавоноида. Среди них и предупреждение апоптоза различных видов клеток, и индукция апоптоза, и вазорелаксация, и противовоспалительное, и антипролиферативное действие, и многое другое [9-15].

Первое сообщение о том, что биофлавоноиды способны подавлять активность протеасомы появилось в 2001-м году. В лаборатории Dou было показано, что полифенолы зелёного чая (особенно эпигаллокатехин-3-галлат) являются сильными специфичными ингибиторами химотрипсиноподобной активности протеасомы как *in vitro*, так и *in vivo* [16]. В 2005-м году эта же исследовательская группа опубликовала данные, доказывающие аналогичное действие на протеасому экстрактов из зелёного яблока и винограда [17]. Аналогичность структуры полифенолов из зелёного чая и кверцетина, а также высокое содержание последнего в экстрактах указанных растений натолкнула нас на мысль о возможном влиянии кверцетина на протеасому. С целью проверки этой гипотезы мы провели исследования с использованием очищенной 20S протеасомы, 26S протеасомы, а также на культуре кардиомиоцитов, подвергнутой аноксии-реоксигенации.

МЕТОДИКА. Для экспериментов *in vitro* использовали очищенную 20S протеасому ("ICN", США) и протеасомальную фракцию II (PF II) из ретикулоцитов кролика ("Sigma", США). Указанная фракция содержит ферменты, участвующие в убиквитинировании (E1, E2), и 26S протеасому [18]. 20S протеасому (2,5 мкг) инкубировали в течении тридцати минут при 36°C с различными концентрациями (5, 10 и 20 мкМ) класто-лактоцистин-β-лактона или кверцетина, а затем добавляли специфические флуорогенные субстраты для определения трех активностей протеасомы [16]. PF II (2,5 мкг) подвергали воздействию указанных веществ в той же концентрации в аналогичных условиях с последующим определением интенсивности гидролиза флуорогенных субстратов. Флуорогенный пептидный субстрат Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амидо-4-метилкумарин использовали для определения химотрипсиноподобной, Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-амидо-4-метилкумарин - трипсиноподобной активности, а CBZ-Leu-Leu-Glu-7-амидо-4-метилкумарин - пептидилглютамил-пептид-гидролазной активности протеасомы. Через 30 мин (для трипсиноподобной активности) или же 60 мин (для остальных типов активности) инкубации с 6 мкМ соответствующих флуорогенных субстратов проводилась регистрация флуоресценции продуктов гидролиза (длина волны возбуждения/эмиссии - 360/440) на спектрофлуориметре Hitachi-4000 с использованием свободного 7-амино-4-метилкумарина в качестве стандарта. В каждом опыте определяли процент подавления гидролиза соответствующего субстрата под действием кверцетина или класто-лактоцистин-β-лактона по сравнению с контрольными пробами, содержащими соответствующее количество диметилсульфоксида.

Опыты *in vivo* выполнены на первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов, полученных из миокарда желудочков двухдневных крыс путём ферментативного гидролиза [19]. Количество живых и погибших клеток определяли с помощью метода исключения 0,2% раствора трипанового синего, которое составляло 90-95% и 5-10% соответственно. Клетки высаживали на стекла с плотностью 120000 на 1 см². Культивирование проводили при 37°C в газовой среде - 5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха на протяжении 1-2 суток. Питательная среда состояла из следующих ингредиентов: среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среда 199 (соотношение DMEM/199 - 4:1), телячья сыворотка - 15%, Na₂CO₃ - 4,2 мМ, HEPES - 15 мМ и антибиотики (стрептомицин - 100 мкг/мл, гентамицин - 0,05 мг/мл, пенициллин - 100 ЕД/мл). Интактные кардиомиоциты подвергали воздействию кверцетина (от 2,5 до 10 мкМ), его водорастворимого аналога корвитина (от 2,5 до 10 мкМ) и специфического ингибитора протеасомы класто-лактацистин-β-лактона (от 2,5 до 10 мкМ) в течении 90 минут.

В следующей серии опытов моделировали аноксию-реоксигенацию кардиомиоцитов путём аэрации клеток бескислородной газовой смесью следующего состава: 5% CO₂ и 95% Ar на протяжении 30 мин с последующей заменой питательной среды и культивированием клеток в исходных условиях на протяжении 60 мин. Кверцетин (2,5 мкМ), корвитин (2,5 мкМ) и специфический ингибитор протеасомы класто-лактистин-β-лактон (2,5 мкМ) добавляли к среде непосредственно перед аноксией. Количество живых, некротических и апоптотических клеток определялось цитологически с помощью окраски бис-бензими́дом (Hoechst 33342) и пропидиум йодидом (8,75 мкМ). Для выявления аутофагических вакуолей суправитально использовали специфический краситель – монодансилкадаверин в концентрации 50 мкМ [20].

Для биохимического исследования клетки диспергировали с помощью скребка и озвучивали с максимальной интенсивностью в течении трех мин с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН А. Оставшиеся нелизированные клетки, мембраны и ядра удаляли путём центрифугирования при 3000 g в течение 10 мин. Супернатант инкубировали в буфере, содержащем: 25 mM трис-HCl (pH 7,5), 1 mM дитиотреитол и 6 мкМ соответствующего флуорогенного субстрата (см. выше). Специфичность протеасомного гидролиза подтверждали с помощью специфических ингибиторов протеасомы - 2,5 мкМ класто-лактистин-β-лактона и 5 мкМ Z-Leu-Leu-Leu-al (MG 132). Процент подавления активности гидролиза соответствующих субстратов под действием указанных ингибиторов трактовали как протеасомальную активность, которую выражали в нмоль 7-амино-4-метилкумарина (АМС) на 10⁶ клеток в 1 мин.

Полученные результаты обрабатывали математически на ПК с использованием программы Origin 7.0 и Excel 2000. Достоверность разницы средних величин (p<0,05) определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В экспериментах с очищенной 20S протеасомой показано, что кверцетин дозозависимо подавляет все три пептидазные активности протеасомы, причём степень подавления была сопоставима с таковой при использовании специфического ингибитора протеасомы (табл. 1). В наибольшей степени кверцетин подавляет химотрипсиноподобную активность 20S протеасомы – от 80% до 65% в зависимости от концентрации. Трипсиноподобная активность снижалась на 30-10%, а пептидилглутамил-пептидгидролазная – на 61–50%. Аналогичным образом кверцетин ингибирует активность 26S протеасомы из PF II (табл. 1), однако эффективность подавления гидролиза специфических субстратов была значительно меньшей, чем у класто-лактистин-β-лактона.

Таблица 1. Влияние класто-лактистин-β-лактона и кверцетина на активность различных форм протеасомы (% от контрольной активности, принятой за 100%).

		Активность 20S протеасомы			Активность 26S протеасомы из PF II		
		(% от контроля)			(% от контроля)		
		LLVT	LSTA	LLG	LLVT	LSTA	LLG
Концентрация класто-лактистин-β-лактона, мкМ	5	24,0±1,87	78,0±0,32	59,6±0,51	10,5±0,5	16,6±0,51	38,6±0,81
	10	14,6±0,51	71,4±0,51	51,6±0,93	6,94±0,26	7,0±0,35	20,2±0,37
	20	8,6±0,51	68,0±0,71	43,4±1,21	4,84±0,22	1,98±0,16	8,4±0,29
Концентрация кверцетина, мкМ	5	35,2±0,58	89,6±0,58	60,0±0,86	84,6±0,75	64,4±0,68	55,8±0,37
	10	28,4±1,21	81,0±0,45	53,6±0,81	79,2±0,66	58,0±0,84	47,4±0,68
	20	19,8±0,37	72,2±0,73	46,4±0,51	75,8±0,37	53,6±0,51	40,0±0,71

Примечание: LLVT – химотрипсиноподобная, LSTA – трипсиноподобная, LLG – пептидилглутамил пептид-гидролазная активности протеасомы. Приведены средние значения ± ошибка средней 5 опытов, p<0,05 по сравнению с контролем во всех экспериментах.

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ПРОТЕАСОМЫ

При определении активности протеасомы в изолированных кардиомиоцитах получены следующие результаты (рисунок): кверцетин на 26% ($p=0,03$) подавлял трипсиноподобную активность протеасомы, на 63,7 % ($p=0,04$) - химотрипсиноподобную и на 34,2% ($p=0,16$) - пептидглютамин-пептидгидролазную. Класто-лактоцистин- β -лактон был более эффективен, чем кверцетин, достоверно снижая активность гидролиза всех трёх видов флуорогенных субстратов. Известно, что ингибиторы протеасомы способны вызывать апоптоз и аутофагическую клеточную смерть, а в низких концентрациях оказывают противоположное действие, т.е. способны предупреждать клеточную гибель при воздействии различных повреждающих агентов [20]. На культуре кардиомиоцитов нами впервые показано, что класто-лактоцистин- β -лактон вызывает значительное повышение количества апоптотических и аутофагических клеток в концентрации 5 мкМ и более, а в концентрации 2,5 мкМ существенно не влияет на соотношение живых, некротических, апоптотических и аутофагических клеток. Таким образом, мы установили “неповреждающую” дозу ингибитора, которую и использовали при проведении экспериментов с аноксией-реоксигенацией. Установлено, что класто-лактоцистин- β -лактон, нанесённый до начала аноксии-реоксигенации в концентрации 2,5 мкМ уменьшает количество апоптотических и некротических клеток, увеличивая количество выживших (табл. 2). Кверцетин и его водорастворимый аналог корвитин оказывают принципиально такое же действие. В концентрации 5 и 10 мкМ кверцетин приводил к снижению количества живых кардиомиоцитов до 85,8% и 79,7% соответственно, увеличивая при этом количество некротических (до 5,8% и 8,7%) и апоптотических (5,8% и 8,0%) клеток. Корвитин в тех же концентрациях вызывал понижение количества живых кардиомиоцитов до 88,3% и 79,0% соответственно, увеличивая количество некротических (до 4,0% и 6,1%) и апоптотических (6,1% и 11,5%) клеток. В концентрации 2,5 мкМ кверцетин и корвитин (табл. 2) в значительной степени нивелировали повреждающее действие аноксии-реоксигенации на кардиомиоциты, уменьшая количество некротических и апоптотических клеток. Аутофагические процессы в кардиомиоцитах, индуцированные аноксией-реоксигенацией, не предупреждаются ни специфическим ингибитором протеасомы, ни использованными препаратами биофлавоноидов (табл. 3).

Таблица 2. Количество (%) живых, некротических и апоптотических кардиомиоцитов в контроле, при моделировании аноксии-реоксигенации и воздействии класто-лактацистин- β -лактона (2,5 мкМ), кверцетина (2,5 мкМ) и корвитина (2,5 мкМ).

	Живые	Некротические	Апоптотические
Контроль n=10	89,8\pm0,90	3,2\pm0,33	5,8\pm0,73
Аноксия-реоксигенация (30-60 мин) n=10	79,1\pm1,31 p₁ < 0,001	7,7\pm1,11 p₁ < 0,001	11,9\pm1,04 p₁ < 0,001
Класто-лактацистин-β-лактон + аноксия-реоксигенация n=7	85,9\pm0,47 p < 0,001 p₁ = 0,0046	4,0\pm0,42 p = 0,015 p₁ = 0,18	6,57\pm0,40 p < 0,001 p₁ = 0,44
Кверцетин + аноксия- реоксигенация n=5	88,3\pm0,77 p < 0,001 p₁ = 0,32 p₂ = 0,02	4,3\pm0,93 p = 0,07 p₁ = 0,18 p₂ = 0,69	5,1\pm0,64 p < 0,001 p₁ = 0,55 p₂ = 0,07
Корвитин + аноксия- реоксигенация n=5	89,1\pm0,77 p < 0,001 p₁ = 0,67 p₂ = 0,003	4,9\pm0,82 p = 0,11 p₁ = 0,04 p₂ = 0,3	5,3\pm0,70 p = 0,001 p₁ = 0,65 p₂ = 0,12

Примечание: Здесь и в табл. 3: p - по сравнению с группой аноксия-реоксигенация; p₁ - по сравнению с контрольной группой; p₂ - по сравнению с группой класто-лактацистин β -лактон + аноксия-реоксигенация.

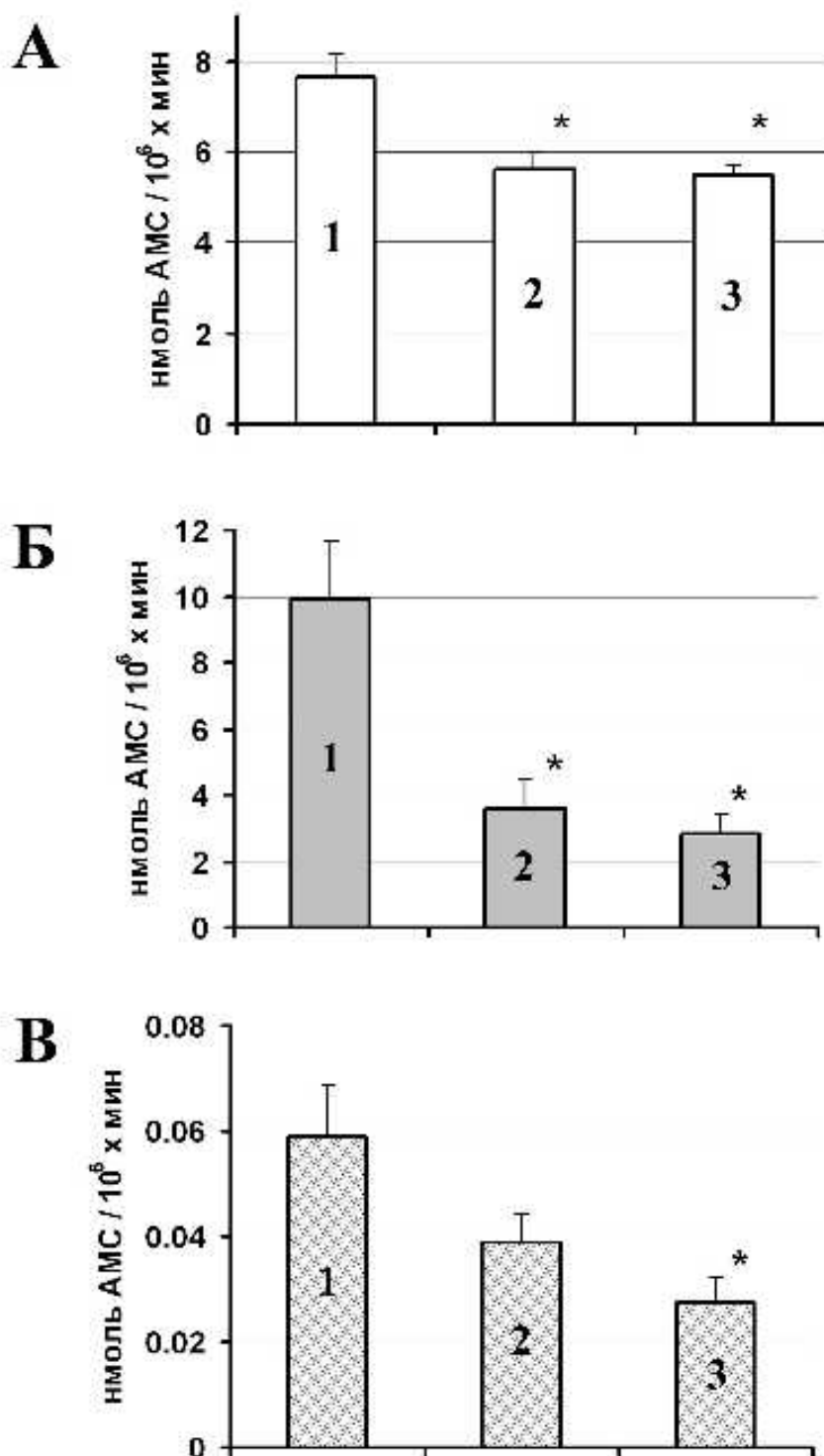


Рисунок.

Влияние кверцетина и клас-то-лактацин-β-лактона на трипсино-подобную (А), химотрипсиноподобную (Б) и пептидглютамин-пептид-гидролазную (В) активность протеасом в изолированных кардиомиоцитах. 1 - контроль, 2 - воздействие кверцетина (5 мкМ) в течение 90 мин, 3 - воздействие клас-то-лактацин-β-лактона (5 мкМ) в течение 90 мин.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ПРОТЕАСОМЫ

Таблица 3. Количество (%) кардиомиоцитов с признаками аутофагии в контроле, при моделировании аноксии-реоксигенации и воздействии класто-лактацистин-β-лактона (2,5 мкМ), кверцетина (2,5 мкМ) и корвитина (2,5 мкМ).

Условия опыта	Аутофагические клетки
Контроль n=10	4,3 ± 0,23
Аноксия-реоксигенация (30-60 мин) n=10	14,2 ± 0,96 p₁ < 0,0001
Класто-лактацистин β-лактон + аноксия- реоксигенация n=7	17,8 ± 1,26 p=0,39 p₁ < 0,0001
Кверцетин + аноксия-реоксигенация n=5	16,9 ± 0,81 p=0,1 p₁ < 0,0001 p₂ = 0,6
Корвитин + аноксия-реоксигенация n=5	17,1 ± 1,30 p=0,1 p₁ < 0,0001 p₂ = 0,7

Таким образом, кверцетин в условиях *in vitro* и *in vivo* эффективно подавляет активность протеасомы. Полученные данные представляют значительный интерес в плане объяснения механизмов действия кверцетина на различные биологические процессы. По-нашему мнению, большинство из них связано именно с влиянием этого биофлавоноида на активность протеасомы, поскольку доза кверцетина, угнетающая активность протеасомы, значительно меньше, чем концентрации, используемые для подавления других ферментов или достижения определенных эффектов. Например, влияние кверцетина на активность многих протеинкиназ проявляется лишь в концентрации 20 мкМ и выше [6], подавление экспрессии белков теплового шока происходит при добавлении кверцетина в дозе 30-100 мкМ [8], подавление выделения ряда провоспалительных медиаторов также требует 100 мкМ кверцетина [11], существенное подавление роста опухолевых клеток за счёт подавления инозитол-3-фосфат-киназ наблюдается при концентрации 70 мкМ [9], а активность эндотелиальной NO-синтазы угнетается при концентрации 220 мкМ [21]. В этих концентрациях, по крайней мере в культуре кардиомиоцитов, кверцетин вызывает апоптотическую и аутофагическую гибель клеток, а существенное подавление активности протеасомы происходит уже при воздействии 5 мкМ указанного вещества. Из этого следует, что, прежде всего, кверцетин действует как ингибитор протеасомы, а только затем проявляется его действие на другие внутриклеточные системы. Только активность липоксигеназ, по данным отдельных исследований, эффективно подавляется кверцетином в низких концентрациях [5].

Низкие концентрации кверцетина вызывают эффекты четко связанные с подавлением протеасомного протеолиза. Например, испанские учёные наблюдали накопление ингибитора ядерного фактора В, деградация которого происходит протеасомальным путем при действии на клетку интерлейкинов [22]. Подавление дифференциации и активации остеокластов, обеспечивающее замедление резорбции кости, индуцируется кверцетином при концентрации 2-5 мкМ [10]. Однако, действие кверцетина и специфических ингибиторов протеасомы не всегда совпадает. В частности, показано, что кверцетин предупреждает активацию индуцируемого гипоксией фактора (HIF) при том, что именно протеасома обеспечивает его деградацию в условиях нормоксии [23]. В работе Pritts и соавт. установлено, что ингибиторы протеасомы индуцируют экспрессию HSP, а кверцетин устраняет этот эффект, хотя он связан с замедлением протеасомальной деградации киназы транскрипционного фактора HSP – HSF-1 [24]. Эти и другие

данные свидетельствуют о том, что кверцетин имеет множество мишеней в клетке. Многие ранее описанные механизмы действия кверцетина и других биофлавоноидов, по всей видимости, связаны с его влиянием на протеасомный протеолиз. В частности, хорошо известно, что протеасомной деградации подвергаются практически все белки с коротким сроком полужизни – протеинкиназы, про- и антиапоптотические белки, факторы транскрипции, их ингибиторы и т.д. [25].

Способность кверцетина и других биофлавоноидов ингибировать протеасому имеет большое практическое значение, т.к. химические агенты, обладающие таким свойством, рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты [9, 16, 17]. Также большие надежды возлагаются на ингибиторы протеасомы в качестве кардиопротекторных средств, позволяющих уменьшить повреждающее действие ишемии и последующей реперфузии [13-15]. На модели аноксии-реоксигенации неонатальных кардиомиоцитов нами показано, что кверцетин и корвитин, так же как специфический ингибитор протеасомы предупреждают апоптотическую и некротическую гибель клеток. По-видимому, антиоксидантные свойства кверцетина в данном случае не имеют решающего значения, т.к. при увеличении концентрации кверцетина эффект не усиливается, а меняется на противоположный – количество погибших клеток увеличивается. Фактически, подавление протеасомы до начала аноксии вызывает эффект так называемого прекодиционирования – активно изучаемого феномена повышенной устойчивости клеток к ишемии-реперфузии в результате предварительного воздействия повреждающих факторов умеренной силы.

Разработанный и внедренный в клиническую практику водорастворимый препарат кверцетина “Корвитин” хорошо зарекомендовал себя при лечении острого инфаркта миокарда. Установленный факт влияния кверцетина на активность протеасомы позволяет глубже понять многие эффекты указанного фармацевтического препарата и, возможно, значительно расширить сферу его клинического применения. Одновременно, доказанное воздействие кверцетина на одну из ключевых внутриклеточных систем – убиквитин-зависимый протеасомальный протеолиз – требует повышенного внимания и осторожности при клиническом использовании препаратов на основе биофлавоноидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graziani Y. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, **460**, 364-373.
2. Graziani Y., Chayoth R. (1979) *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 397-403.
3. Kuriki Y., Racker E. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4951-4956.
4. Malterud K.E., Rydland K.M. (2000) *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5576-5580.
5. Sadik C.D., Sies H., Schewe T. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 773-781.
6. Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. (2000) *Biochem. J.*, **351**, 95-105.
7. Spencer J.P., Rice-Evans C., Williams R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34783-34793.
8. Hosokawa N., Hirayoshi K., Kudo H., Takechi H., Aoike A., Kawai K., Nagata K. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, P.3490-3498.
9. Li W., Shen F., Weber G. (1999) *Oncol. Res.*, **11**, 243-247.
10. Woo J.T., Nakagawa H., Notoya M., Yonezawa T., Udagawa N., Lee I.S., Ohnishi M., Hagiwara H., Nagai K. (2004) *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 504-509.
11. Theoharides T.C., Alexandrakis M., Kempuraj D., Lytinas M. (2001) *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **14**, 119-127.
12. Rendig S.V., Symons J.D., Longhurst J.C., Amsterdam E.A. (2001) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **38**, 219-227.
13. Колчин Ю.Н., Максютин Н.П., Баланда П.П., Луйк А.И., Булах В.Н., Мойбенко А.А. (1991) *Фармакол. токсикол.*, **54**, 20-23.
14. Колчин Ю.Н., Попович Л.Ф., Грабовский Л.А., Луйк А.И., Мойбенко А.А. (1990) *Кардиология*, **30**, 72-75.

15. Soloviev A., Stefanov A., Parshikov A., Khromov A., Moibenko A., Kvotchina L., Balavoine G., Geletii Y. (2002) *Cardiovasc. Toxicol.*, **2**, 129-139.
16. Nam S., Smith D.M., Dou Q.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 13322-13330.
17. Chen M.S., Chen D., Dou Q.P. (2004) *In Vivo*, **18**, 73-80.
18. Giulivi C., Davies K.J.A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8752-8753.
19. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Charles E.M. (1999) *Circulation*, **100**, 193-202.
20. Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Нагібін В.С., Макогон Н.В., Мойбенко О.О. (2004) *Физиологический журнал*, **50**, 11-18.
21. Chiesi M., Schwaller R. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 495-501.
22. Martinez-Florez S., Gutierrez-Fernandez B., Sanchez-Campos S., Gonzalez-Gallego J., Tunon M.J. (2005) *J. Nutr.*, **135**, 1359-1365.
23. Hasebe Y., Egawa K., Yamazaki Y., Kunimoto S., Hirai Y., Ida Y., Nose K. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1379-1383.
24. Pritts T.A., Hungness E.S., Hershko D.D., Robb B.W., Sun X., Luo G.J., Fischer J.E., Wong H.R., Hasselgren P.O. (2002) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **282**, 1016-1026.
25. Веремеєнко К.Н., Досенко В.Є., Нагібін В.С., Кизим А.І., Мойбенко А.А. (2003) *Укр. біохім.ж.*, **75**, 20-34.

Поступила: 26. 07. 2005.

THE INFLUENCE OF QUERCETIN ON THE ACTIVITY OF 20S, 26S PROTEASOME AND PROTEASOMAL ACTIVITY IN ISOLATED CARDIOMYOCYTES

V.E. Dosenko, V.Yu. Zagoriy, V.S. Nagibin, L.V. Tumanovskaya, A.A. Moibenko

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science, Ukraine, Department of Experimental Cardiology, Bogomoltza ul., 4, Kiev, 01024 Ukraine; tel./fax: 38(044)256-20-73

For the clarification of the effect of quercetin on the proteasome experiments were performed using purified 20S proteasome, 26S proteasome from the proteasomal fraction II (PF II), as well as cardiomyocyte culture which underwent anoxia-reoxygenation. In the experiments with purified 20S proteasome it was shown, that quercetin in a dose-dependent manner inhibits all three peptidase activities of the proteasome, comparable to a specific proteasome inhibitor. The highest quercetin inhibition was observed in the case of chymotrypsin-like activity of proteasome. In the same way quercetin inhibited the activity of 26S proteasome from the PF II. Quercetin decreased trypsin-like (by 26%, $p = 0.03$), chymotrypsin-like (by 63.7%, $p = 0.04$) and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing (by 34.2%, $p = 0.16$) activities in the cardiomyocytes culture. It appears, that quercetin and its water-soluble analogue korvutin affect the cardiomyocytes in the same manner, as specific proteasome inhibitors clasto-lactacystin- β -lactone. In the concentrations 5 and 10 mM quercetin and korvutin resulted in the decrease of the amount of living cardiomyocytes, increasing the amount of necrotic and apoptotic cells. In the concentration 2.5 mM quercetin and korvutin significantly abolished damaging effect of anoxia-reoxygenation, decreasing the amount of necrotic and apoptotic cells. These data suggest that the mechanisms of cardioprotective effect of quercetin connected with inhibition of proteasome.

Key words: proteasome, quercetin, cardiomyocytes, anoxia-reoxygenation.