

УДК 615.014.425; 547,979,4

©Коллектив авторов

ДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНА НА ВЫЗВАННУЮ ОКСИДОМ АЗОТА СТРУКТУРНУЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ЦИСТАТИНА ИЗ МОЗГА КОЗ

С. Сумбул, М.С. Хан, Б. Бано*

Кафедра биохимии, факультет биологии, университет Алигарх Мислим, Алигарх 202002, Итар Прадеш, Индия; тел.: +91-571-2700857; факс: +91-571-2702758; эл. почта: bilqees2007@gmail.com.

Цистатины – ингибиторы тиоловых протеиназ повсеместно присутствуют в тканях млекопитающих. В мозгу они предотвращают нежелательный протеолиз и включаются в патогенез некоторых нейродегенеративных заболеваний. При физиологических условиях оксид азота может быть обнаружен почти во всех тканях, но при патологических условиях NO оказывает повреждающий эффект. Увеличение его концентрации при различных нейральных патологиях приводит к разрушению клеток из-за образования высокореактивного пероксинитрита. В представленных нами результатах показано защитное действие куркумина против разрушающего действия NO на высокомолекулярный цистатин из мозга коз. NO вызывает интенсивные структурные и функциональные нарушения цистатина, достигающие 89% потерь антипротеолитической активности после 2-х часовой совместной инкубации. Структурные повреждения происходят в виде усиленной деградации белков. Куркумин значительно предохраняет высокомолекулярный цистатин из мозга коз от подобных повреждений. Эти данные наводят на мысль, что куркумин обладает большим потенциалом в лечении болезней, вызванных действием свободных радикалов азота, и этот потенциал должен быть использован для разработки в дальнейшем новых лекарств.

Ключевые слова: оксид азота, высокомолекулярный цистатин из мозга коз, антипротеолитическая активность, куркумин.

ВВЕДЕНИЕ. Куркумин (рис. 1) - главный компонент, экстрагируемый из порошка высушенных корневищ куркумы длинной *Curcuma longa* L. (*Zingiberaceae*).

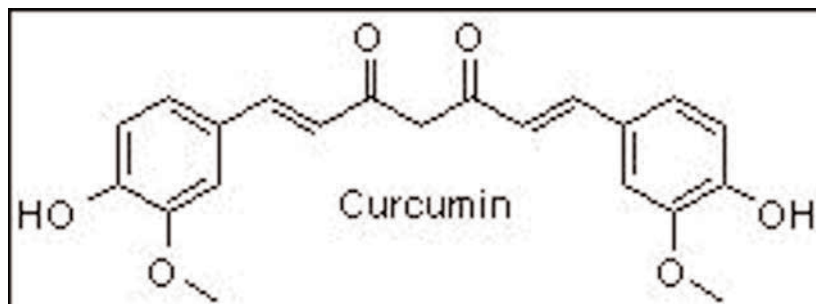


Рисунок 1.

Химическая структура куркумина.

* - адресат для переписки

Это растение традиционно используется в Индии для еды и медицинских целей. Куркумин (К) обладает различными химическими, биологическими и фармакологическими свойствами, включая антиоксидантную [1, 2] и противовоспалительную активности [3, 4]. Более того, об антиканцерогенной активности К сообщалось при различных, вызванных химикатами, опухолях, включая пищеварительные органы [5, 6], раки кожи [7] и клеточные линии [8-10].

Хотя точный механизм, с помощью которого К проводит эти эффекты, ещё предстоит выяснить, антиоксидантные свойства этого пигмента по-видимому лежат в основе его плеiotропных биологических активностей [11].

Окисление и образование свободных радикалов является интегральной частью обмена у млекопитающих. В группу свободных радикалов включаются супероксиды, гидроксилы, пероксиды, алкоксиды, тиилы и оксиды азота (NO^\bullet , NO_2^\bullet). Оксид азота (NO^\bullet) является неорганическим свободным радикалом, синтезированным из газа семейством изоферментов синтаз оксида азота. Он локализуется в различных тканях, включая мозг, и играет активную роль в биологии свободных радикалов и рака [12]. Он играет жизненно важную роль как клеточно-сигнализирующая молекула в сосудистой, нервной и иммунной системе [13]. Интенсивный и нерегулируемый синтез оксида азота рассматривается как причинный или опосредованно приводящий к патофизиологическим условиям, включая многие заболевания, завершающиеся летальным исходом, а также изнуряющие заболевания [14].

Цистатины – это ингибиторы тиоловых протеиназ, повсеместно обнаруженные в тканях млекопитающих [15]. Они предохраняют клетки от разрушения, предотвращая преждевременный протеолиз. Они активно участвуют в создании различных патологических состояний, включая болезнь Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний [16-17].

В настоящей работе мы исследовали действие свободных радикалов оксида азота на цистатин высокой молекулярной массы, выделенного из мозга коз (Ц), и очищающий и предохраняющий эффект К против такого повреждения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Реактивы. Папаин, нитрит натрия (НН), дитионит натрия (ДТН), реактив Грисса, Сефадекс G-100 и К производства “Sigma Chemical Co” (США). ДЕАЕ-целлюлоза производства “SRL” (Индия). Все остальные химикаты были самой высокой чистоты, существующей в продаже.

Очистка Ц. Ц был выделен и очищен из мозга коз по методу Sumbul и Vano [18]. Вкратце процедура сводилась к следующему - свежий мозг коз, собранный на бойне (150 г), гомогенизировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (300 мл) pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl, 3мМ ЭДТА и 2% бутанол, гомогенат центрифугировали 30 мин при 3500 g. Образовавшийся супернатант подвергали затем щелочной обработке при pH 11,0 с использованием 3,0 М NaOH, а затем центрифугировали. После центрифугирования супернатант подвергали окончательному 30-80% фракционированию сульфатом аммония. Полученный осадок растворяли в 50 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7,5 и трижды диализовали против 100 объемов того же буфера, содержащего 0,15 М NaCl. Белковый раствор наносили на колонку с Сефадексом G-100 и элюировали тем же буфером. При дальнейшей очистке использовали ионо-обменную хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе при pH 8,0. Собираемые фракции анализировали затем на ингибирующую активность и на содержание белка, фракции с максимальным ингибированием объединялись и концентрировались. Очищенный Ц давал одну полосу при нативном 7,5% ПАГ электрофорезе. Молекулярная масса белка, определённая в СДС-ПАГ электрофорезе на 12,5% геле, была найдена равной 70800 дальтон. Во всех пробах содержание белка определяли по методу Лоури [19].

Определение ингибитора тиоловых протеиназ. Ингибиторную активность Ц против папаина определяли как описано Kunitz [20]. Ц инкубировали с NO в присутствии и отсутствии К.

Обработка Ц с NO. Ц обрабатывали оксидом азота, образованным при редукции НН с ДТН как описано ранее [21]. Модификация проводилась путём варьирования временных интервалов инкубации (0 мин – 3 часа) при 37°C. Реакционная смесь содержала Ц (100 нмоль), НН (100 мМ) и ДТН (10 мМ). После инкубации реакционную среду диализовали против 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,5 для определения активности и электрофореза. Пробы нативного Ц, инкубированные с одним НН (100 мМ) или с одним ДТН (10 мМ), использовали как контроли.

Обработка Ц в присутствии К. Запасной раствор К (1 мМ) готовили растворением в абсолютном этаноле. Ц инкубировали с реактивами, образующими NO (как описано выше), в присутствии различных концентраций К (0-300 мкМ) в течение 2 часов при 37°C. Для ПАГ электрофореза, флуоресцентных исследований и определения активности смесь диализовали против 50 мМ натрий-фосфатного буфера.

Для оценки очищающей способности К от действия оксида азота 100 мкМ К инкубировали со 100 мМ НН и 10 мМ ДТН в 50 мМ натрий-фосфатном буфере в течение 2 часов. В конце инкубации реакционную смесь собирали для измерения нитрита, образованного из NO, с использованием реактива Грисса [22].

Электрофорез в полиакриламидном геле. Ц (500 нмоль), обработанный NO в течение различных интервалов времени, был исследован нативным ПАГ электрофорезом с использованием 10% геля, подробно описанным Laemmli [23], в трис-глициновом буфере, pH 8,3. Различные концентрации К с Ц и NO также были анализированы нативным ПАГ электрофорезом. Гели были окрашены по ранее описанному методу.

Флуоресцентная спектроскопия. Измерения собственной флуоресценции проводились на спектрофлуориметре модели Shimadzu RF-450, снабжённом рекордером данных DR-3 при 25±1°C. Флуоресценция регистрировалась в пределах длин волн 300-400 нм после возбуждения раствора белка при 280 нм для общей флуоресценции белка. Ширина щели была 5 нм для возбуждения и эмиссии. Длина оптического пути пробы была равна 1 см. Для флуоресцентных измерений использовали 1 мкМ Ц. Соответствующие контроли были проведены, и поправки внесены, когда было необходимо. Каждый спектр был усреднённым как минимум из четырёх сканеров.

8-анилино-нафтален-сульфоновая кислота (ANS), флуоресцентные измерения. Флуоресцентные спектры регистрировались с помощью спектрофлуориметра Shimadzu (см выше). Ц инкубировали с химикатами, образующими NO, в присутствии или отсутствии К в течение 2 часов при 37°C. Пробы затем смешивали с концентрированным запасным раствором (1 мкМ) ANS, растворённым в метаноле. Длина волны возбуждения была выбрана равной 365 нм, а эмиссию регистрировали при длинах волн 400-600 нм. Во всех опытах молярное соотношение белка и ANS было приблизительно равно 1:60. Соответствующие контроли были проведены и при необходимости поправки были введены. Каждый спектр был усреднённым из четырёх и более опытов.

Данные анализов. Данные выражались как среднее арифметическое ± SE (n=3). Все эксперименты проводились с параллельными и каждый эксперимент повторяли не менее трёх раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Действие оксида азота на Ц.

Функциональная инактивация Ц с помощью NO. Оксид азота, образованный в реакции НН (100 мМ) и ДТН (10 мМ) вызывал потерю ингибирующей активности Ц (табл. 1). Инкубация Ц с в течение часа приводила к образованию соединения с потерей ингибирующей активности более 50%, тогда как инкубация в течение 2 часов приводила к потере почти 90% ингибирующей активности Ц. Общая (100%) потеря ингибирующей активности наблюдалась после 3-х часовой инкубации с NO (табл. 1).

ДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНА НА МОДИФИКАЦИЮ ЦИСТАТИНА МОЗГА

Таблица 1. Действие варьирующих временных интервалов инкубации с NO на антипротеолитическую активность Ц.

№ опыта	Условия опыта	% оставшейся активности	% потери активности
1	Нативный Ц	90±1,5	0
2	Нативный Ц+ НН+ДТН (0 мин)	89±2	1,11
3	Нативный Ц+ НН+ДТН (15 мин)	76,8±1,5	14,7
4	Нативный Ц+ НН+ДТН (30 мин)	67,9±2,1	24,56
5	Нативный Ц+ НН+ДТН (45 мин)	42,3±2,2	52,97
6	Нативный Ц+ НН+ДТН (60 мин)	34,5±2,2	61,67
7	Нативный Ц+ НН+ДТН (90 мин)	22,1±1,3	75,44
8	Нативный Ц+ НН+ДТН (120 мин)	10,3±2,1	88,56
9	Нативный Ц+ НН+ДТН (150 мин)	2,1±1,1	97,67
10	Нативный Ц+ НН+ДТН (180 мин)	0	100

Примечание: Здесь и далее Ц инкубировался с 100 мМ Н и 10 мМ ДТН. Ингибиторная активность измерялась казеинолитическим методом.

Структурная модификация Ц с помощью NO. Структурные изменения Ц с NO исследовались с помощью полиакриамидного геля (ПАГ) электрофореза и измерением собственной и наведенной (bis-ANS) флуоресценции. Результаты ПАГ электрофореза показали, что инкубация Ц с NO в течение 0-2-х часов вызывала деградацию белка (рис. 2). Увеличение времени инкубации с 2 до 4-х часов приводило к образованию агрегатов, что проявлялось сдвигом белковой полосы в верхнее положение на геле (рис. 3). Результаты определения собственной флуоресценции показали экспозицию триптофановых остатков (0-2 часа), что приводило к увеличению собственной флуоресцентной интенсивности при 335 нм (табл. 2). Последующее увеличение времени инкубации от 2 до 3 часов сопровождалось снижением собственной флуоресценции возможно благодаря экранированию триптофановых остатков при образовании агрегатов (рис. 3). Наведенная флуоресценция с bis-ANS также показала, что NO вызывал разрушение гидрофобного ядра Ц (табл. 2). Инкубация Ц с NO приводила к экспозиции гидрофобных фрагментов, что определялось по увеличению флуоресценции при 480 нм. Однако, когда время инкубации увеличивалось до 3 часов происходило разрушение гидрофобных фрагментов и флуоресценция при 480 нм также снижалась (табл. 2).

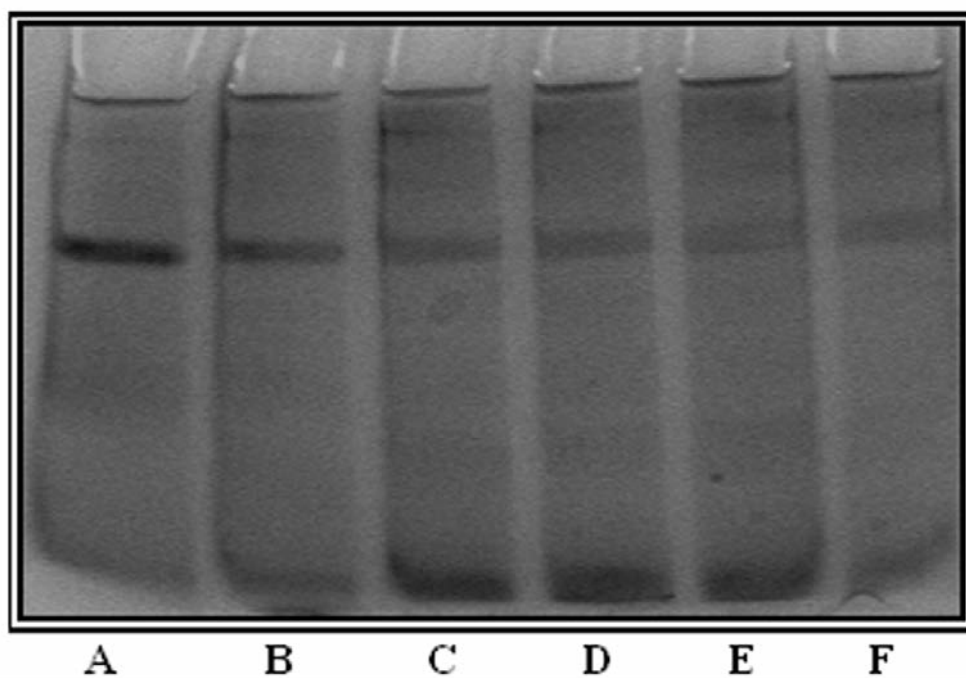


Рисунок 2.

ПАГ электрофорез Ц (500 нмоль) инкубированный с 100 мМ NH и 10мМ ДТН для различных интервалов времени. Трасса А-нативный Ц, трассы В,С,Д,Е и F - содержат Ц, инкубированный с NH и ДТН в течение 15, 30, 60, 90 и 120 мин.

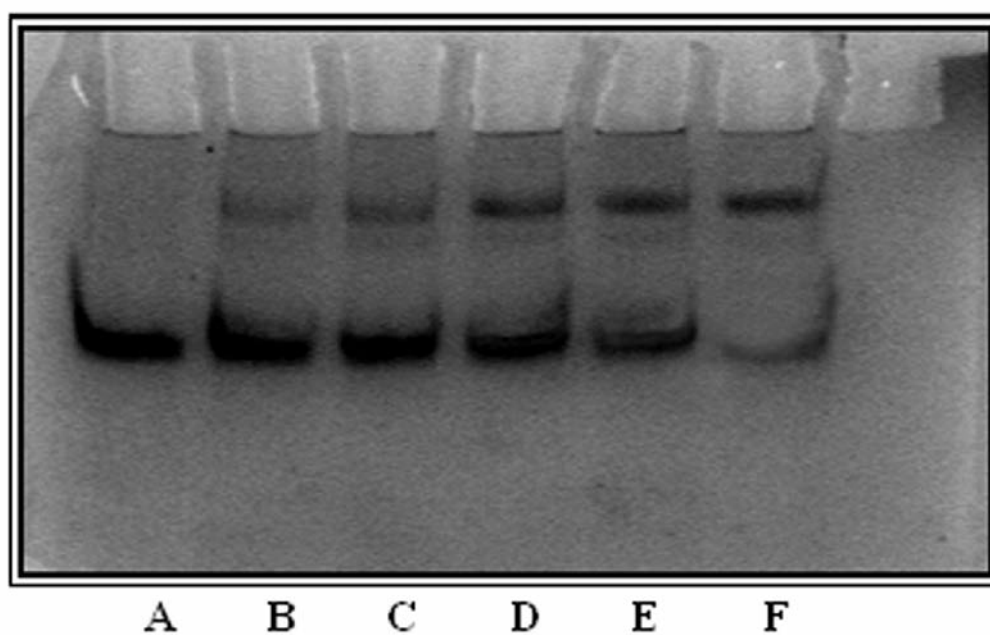


Рисунок 3.

То же, что на рисунке 2, но время инкубации 150, 180, 195,210 и 240 мин.

ДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНА НА МОДИФИКАЦИЮ ЦИСТАТИНА МОЗГА

Таблица 2. Действие различных временных интервалов инкубации Ц с NO на интенсивность собственной и наведённой флуоресценции Ц.

№ опыта	Условия опыта	Интенсивность собственной флуоресценции ($\lambda_{\text{макс.}}=335 \text{ нм}$)	Интенсивность наведённой флуоресценции ($\lambda_{\text{макс.}}=480 \text{ нм}$)
1	Нативный Ц	35,2	15,3
2	Нативный Ц+ НН+ДТН (15 мин)	48,2	17,2
3	Нативный Ц+ НН+ДТН (30 мин)	53,2	18,3
4	Нативный Ц+ НН+ДТН (45 мин)	67,3	24,5
5	Нативный Ц+ НН+ДТН (60 мин)	79,4	26,3
6	Нативный Ц+ НН+ДТН (90 мин)	84,3	29,2
7	Нативный Ц+ НН+ДТН (120 мин)	93,8	34,3
8	Нативный Ц+ НН+ДТН (150 мин)	72,3	22,2
9	Нативный Ц+ НН+ДТН (180 мин)	60,2	11,5

Предохраняющий эффект К против разрушения Ц оксидом азота.

Предотвращение функциональной инактивации Ц. К (0-100 мкМ) был использован для демонстрации его очищающей способности от NO, предохранения Ц от разрушения NO. Было найдено, что 60 мкМ К предотвращает почти 50% потерю функциональной активности Ц, тогда как 100 мкМ К почти полностью предохраняет Ц от инактивации (табл. 3) Для того, чтобы исключить возможность включения азотистых радикалов в повреждение Ц, концентрация нитритов в пробах была измерена с использованием реактива Грисса. Также было найдено, что К препятствует превращению NO в радикалы нитрита, поэтому количество нитрита, образованного из NO, практически не обнаруживалось реактивом Грисса. Концентрации К, использованные в опытах, не влияли на определение концентрации нитритов в смеси с реактивом Грисса (данные не приведены).

Таблица 3. Действие различных концентраций К на протеолитическую активность Ц, обработанную NO.

№ опыта	Условия опыта	% оставшейся активности
1	Нативный Ц	90±1,5
2	Нативный Ц+ НН+ДТН (2 ч)	10,3±2,1
3	Нативный Ц+ НН+ДТН + 20 мкмоль куркумина (2 ч)	25,2±1,1
4	Нативный Ц+ НН+ДТН + 40 мкмоль куркумина (2 ч)	48,4±2,3
5	Нативный Ц+ НН+ДТН + 60 мкмоль куркумина (2 ч)	68,3±2,3
6	Нативный Ц+ НН+ДТН + 80 мкмоль куркумина (2 ч)	77,4±2,2
7	Нативный Ц+ НН+ДТН + 100 мкмоль куркумина (2 ч)	88,4±1,1

Очистка К от оксида азота и его действие на структурную модификацию Ц. К в различных концентрациях (0-100 мкМ) предотвращает деградацию Ц оксидом азота (рис. 4). При инкубации Ц с NO в присутствии 100 мкМ К никаких структурных изменений Ц по ПАГ электрофору не наблюдалось (рис. 4). Результаты измерения собственной флуоресценции также показали, что 100 мкМ К предотвращают какие-либо большие структурные модификации Ц (табл. 4, рис. 5). Результаты исследования наведённой флуоресценции показали, что К предотвращает разрушение гидрофобного ядра Ц путём очистки от NO (табл. 4). Дальнейшие исследования показали, что наблюдается почти 100% возвращение наведённой флуоресценции к нативной флуоресценции Ц в присутствии 100 мкМ (рис. 6).

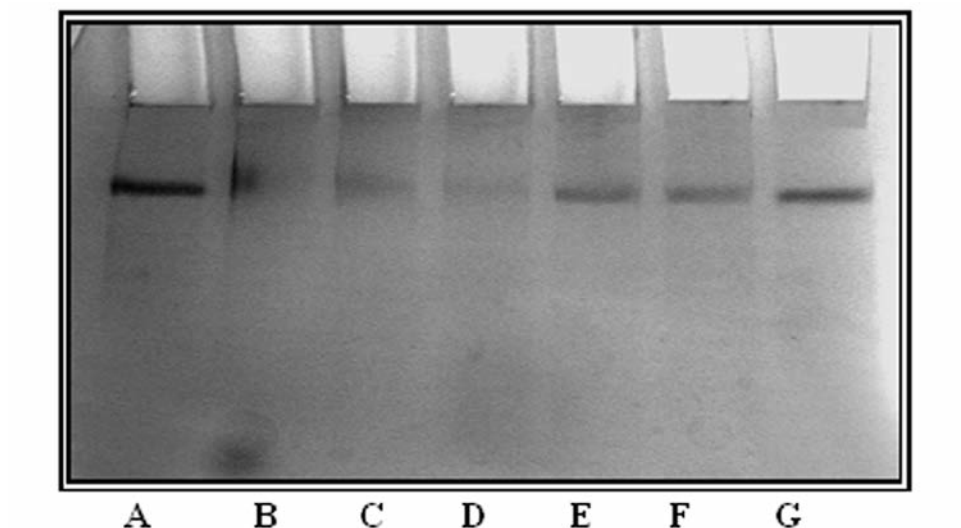


Рисунок 4.

ПАГ электрофорез Ц (500 нмоль), инкубированный с НН и ДТН в присутствии и в отсутствии К. Трасса А - нативный Ц, трасса В - Ц, обработанный NO, трассы С, D, E, F и G - Ц, обработанный К вместе с 20, 40, 60, 80 и 100 мкМ К, соответственно.

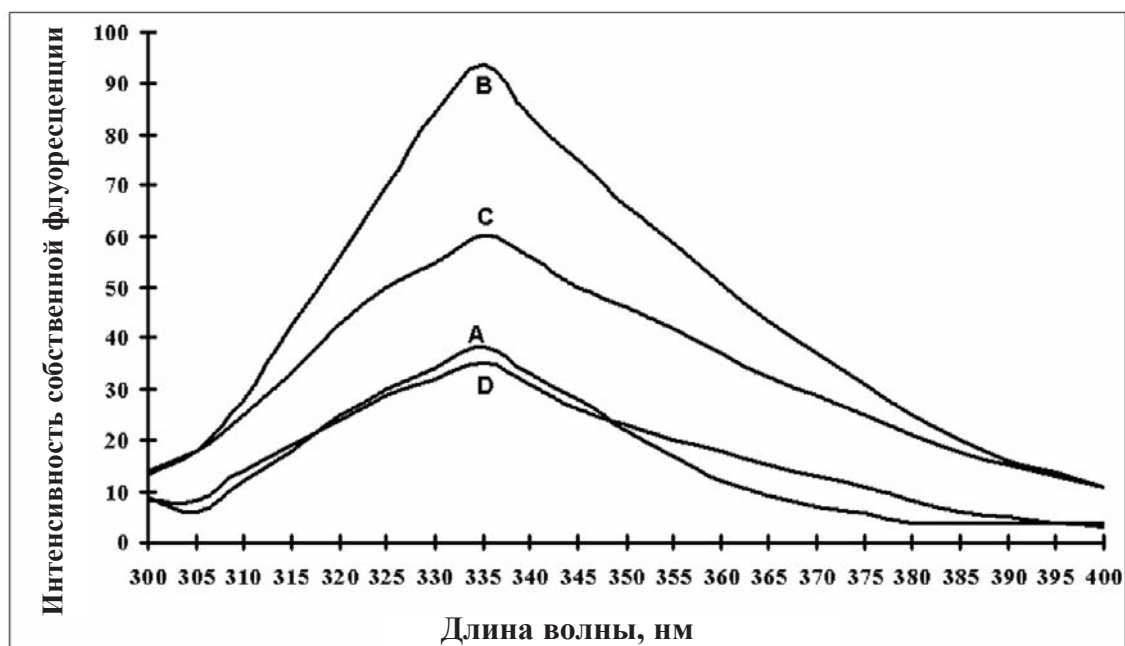


Рисунок 5.

Спектр собственной флуоресценции нативной Ц (А), Ц, обработанной NO в течение 2 часов (В), Ц, обработанной NO в течение 3 часов (С), Ц, обработанной NO в течение 2 часов в присутствии 100 мкМ К (D).

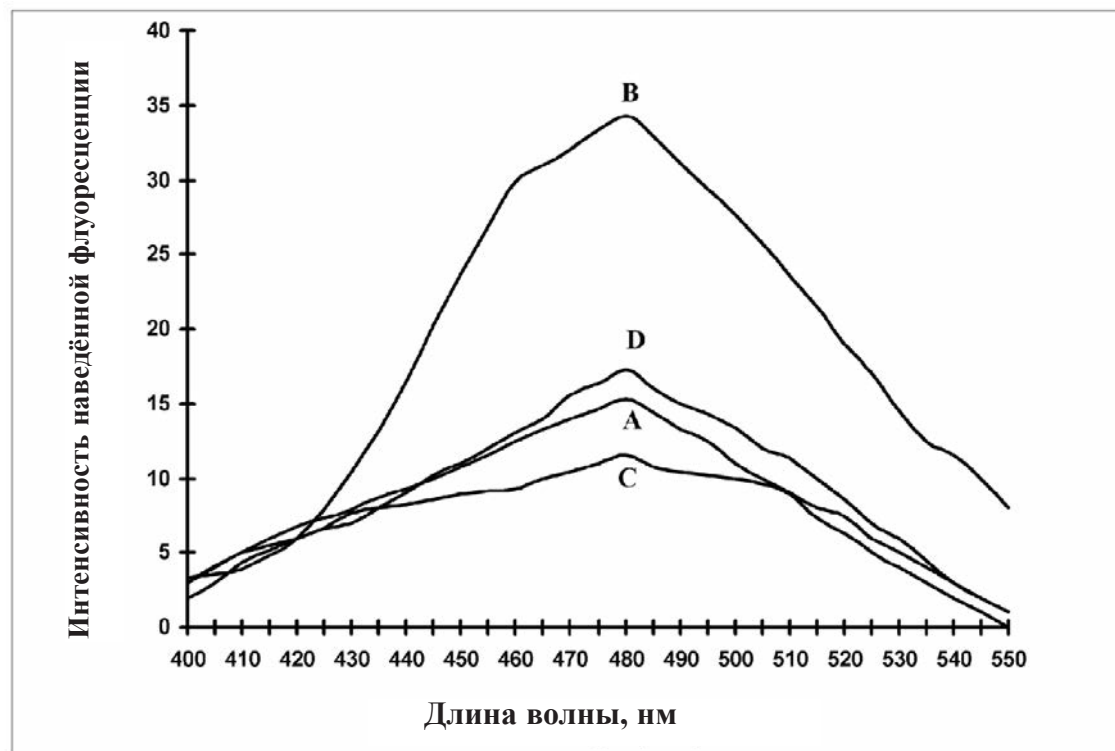


Рисунок 6.

Спектр ANS наведенной флуоресценции Ц. Обозначения те же что на рис. 5.

Таблица 4. Действие различных концентраций К на интенсивность собственной и наведённой флуоресценции Ц, обработанной NO.

№ опыта	Условия опыта	Интенсивность собственной флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}=335$ нм)	Интенсивность наведённой флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}=480$ нм)
1	Нативный Ц	35,2	15,3
2	Нативный Ц+ НН+ДТН (2 ч)	93,8	34,3
3	Нативный Ц+ НН+ДТН + 20 мкмоль куркумина (2 ч)	97,0	32,3
4	Нативный Ц+ НН+ДТН + 40 мкмоль куркумина (2 ч)	92,3	28,4
5	Нативный Ц+ НН+ДТН + 60 мкмоль куркумина (2 ч)	77,3	21,3
6	Нативный Ц+ НН+ДТН + 80 мкмоль куркумина (2 ч)	58,9	19,2
7	Нативный Ц+ НН+ДТН + 100 мкмоль куркумина (2 ч)	36,7	15,9

ОБСУЖДЕНИЕ. NO является плейотропной молекулой необходимой для физиологических функций, особенно в мозге. Окись азота вызывает вазодилатацию, ингибирует апоптоз, играет важную роль в процессах памяти, делая её (окись азота) предполагаемым ценным терапевтическим агентом болезней, ассоциированных с возрастом. Однако NO может быть и вредным фактором, особенно в условиях окислительного стресса из-за окисления функциональных белков. Таким образом, когда NO образуется в избыточных количествах в мозгу, он изменяется от физиологического нейромодулятора до нейротоксического фактора.

В представленной статье мы привели результаты исследования роли К в предотвращении разрушения Ц. Цистатины играют очень важную роль в контроле преждевременного протеолиза в мозге млекопитающих. Из-за своей важной функции они включаются в различные патофизиологические процессы, включая болезнь Альцгеймера [16], церебральную амилоидную ангиопатию [17] и другие нейродегенеративные заболевания [25].

Настоящее исследование показало, что свободные радикалы азотистого оксида вызывают функциональное и структурное разрушение Ц. Найдено, что NO вызывает деградацию Ц (рис. 2), приводящую к его функциональной инактивации (табл. 1). Эта функциональная инактивация может быть связана с окислением остатков триптофана в активном центре, что было показано результатами определения собственной флуоресценции (табл. 2). В настоящей работе далее была исследована предохраняющая роль К против этого повреждения. Было найдено, что К значительно предотвращает это повреждение. Установлено, что 100 мкМ К проявляют очень выраженную защиту против функционального (табл. 3) и структурного повреждения (табл. 4, рис. 5) Ц оксидом азота. Окислительный стресс играет главную роль в патогенезе различных заболеваний, включая миокардиальную ишемию, церебральную ишемию/реперфузионные повреждения, геморрагию и шок, нейральные клеточные повреждения, гипоксию и рак [26]. Сообщалось, что К обладает сильными антиоксидантными свойствами, сравнимыми со свойствами витаминов Е и С [27].

Пищевые добавки К, как было найдено, полезны при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера [28, 29].

Таким образом, в свете наших исследований и ранее сообщённых результатов [30], мы можем сделать заключение, что К обладает очень целебным эффектом против поражений, вызванных радикалами азота. К, по-видимому, будет иметь большое значение в лечении многочисленных болезней, вызванных окислительным стрессом.

В заключение отметим, что предохранительный эффект К обусловлен, главным образом, его антиоксидантными свойствами и в дальнейшем они должны быть тщательно исследованы для более точной оценки благоприятного действия на воспаление и на другие, связанные с окислительным стрессом, состояния и на разработку новых лекарств.

Благоприятные условия, созданные для работы Aligarh Muslim University заслуживают особой благодарности. Авторы благодарны программам SAP-DRS и UGC-FJST за их щедрую поддержку исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruby A.J., Kuttan G., Babu K., Rajasekharan K.N., Kuttan R. (1995) *Cancer Lett.*, **94**, 79-83.
2. Sharma O.P.N. (1976) *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1811-1812.
3. Amon H.P., Wahl M.A. (1991) *Planta Medica*, **57**, 1-7.
4. Satoskar R.R., Shah S.J., Shenoy S.G.A. (1986) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **24**, 651-654.

5. *Huang M-T., Lou Y-R., Ma W., Newmark H.L., Reuhl K.R., Conney A.H.* (1994) *Cancer Res.*, **54**, 5841-5847.
6. *Pereira M.A., Grubbs C. J., Barnes L.H., Li H., Olson G.R., Eto I., Juliana M., Whitaker L.M., Kelloff G.J., Steele V.E., Lubet R.A.* (1996) *Carcinogenesis*, **17**, 1305-1311.
7. *Huang M-T., Ma W., Yen P., Xie J.G., Han J., Frenkel K., Grunberger D., Conney A.H.* (1997) *Carcinogenesis*, **18**, 83-88.
8. *Verma S.P., Salamone E., Goldin B.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 692-696.
9. *Kuo M-L., Huang T-S., Lin J-K.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1317**, 95-100.
10. *Khan A, Ali A.M., Pardhasaradhi B.V.V., Begum Z., Anjum R.* (1999) *FEBS Lett.*, **445**, 165-168.
11. *Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Green C.J.* (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1303-1312.
12. *Tamir S., Tannebaum S.R.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1288**, F31-F36.
13. *Guix F.X., Uribealago I., Coma M., Munoz F.J.* (2005) *Progr. Neurobiol.*, **76**, 126-152.
14. *Benhar M., Forrester M.T., Stamler J.S.* (2006) *ACS Chem. Biol.*, **1**, 355-358.
15. *Turk V. Bode W.* (1991) *FEBS*, **285**, 213-219.
16. *Bernstein H.G., Kirschke H., Wiedernder B., Pollak K.H., Zipress A., Rinne A.* (1996) *Mol. Chem. Neuropathol.*, **27**, 225-247.
17. *Jensson O., Palsdottir A., Thorsteinsson L., Arnason A., Abrahamson M., Olafsson I., Grubb A.* (1990) *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **371**, 229-232.
18. *Sumbul S., Bano B.* (2006) *Neurochem. Res.*, **31**, 1327-1336.
19. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.I., Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
20. *Kunitz M.* (1947) *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291-310.
21. *Dixit K., Ali R.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1528**, 1-8.
22. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skippre P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* (1982) *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138.
23. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
24. *Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J.* (1994) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **28**, 239-242.
25. *Shannon P., Pennacchio L.A., Housewart M.K., Minassian B.A., Myers R.M.* (2002) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **61**, 1085-1091.
26. *Valko M., Lebfreitz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telsar J.* (2007) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **39**, 44-84.
27. *Toda S., Miyase T., Arichi H., Tanizawa H., Takino Y.* (1985) *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1725-1728.
28. *Calabrese V., Butterfield D.A., Stella A.M.* (2003) *Ital. J. Biochem.*, **52**, 177-181.
29. *Yang F., Lim G.P., Begum A.N., Ubeda O.J., Simmons M.R., Ambegaokar S.S., Chen P.P., Kaye R., Glabe C.G., Frautschy S.A., Cole G.M.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 5892-5901.
30. *Sreejayan N., Rao M.N.A.* (1996) *Arzneim-Forsch. Drug Res.*, **46**, 169-171.

Поступила: 01. 03. 2008.

EFFECT OF CURCUMIN ON THE NITRIC OXIDE INDUCED STRUCTURAL AND FUNCTIONAL MODIFICATIONS OF HIGH MOLECULAR MASS GOAT BRAIN CYSTATIN

S. Sumbul, M.S. Khan, B. Bano

Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh-202002, Uttar Pradesh, India; tel.: +91-571-2700857; fax: +91-571-2702758; e-mail: bilqees2007@gmail.com

Cystatins are thiol proteinase inhibitors ubiquitously present in the mammalian body. In brain, they prevent unwanted proteolysis and are involved in several neurodegenerative diseases. Under physiological conditions nitric oxide can be found in almost all the tissues, but under pathological conditions NO has damaging effects. Its increased concentration, under various neural diseases leads to cell damage through formation of highly reactive peroxynitrite. Our present study was designed to investigate the protective effect of curcumin against NO induced damage of HM-GBC. NO caused intensive structural and functional damage of HM-GBC, resulting in 89% loss of its antiproteolytic activity after 2 h of incubation. Structural damage occurs in the form of protein degradation. Curcumin significantly protected HM-GBC against this damage. This suggests that curcumin has a significant potential in the treatment of diseases caused by nitrogen free radicals and this potential must be further explored for the development of novel drugs.

Key words: nitric oxide, high molecular mass goat brain cystatin, antiproteolytic activity, curcumin.