

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.6

© Коллектив авторов

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ПОЛИАМИНАМИ

И.С. Северина, Н.В. Пятакова, А.Ю. Щеголев*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121 Москва,
Погодинская ул. 10; факс: (495)245-0857; эл. почта: irina.severina@ibmc.msk.ru

Исследовано влияние полиаминов (путресцина, спермидина, спермина) на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и на активацию фермента нитропруссидом натрия (НН), YC-1, а также НН в присутствии YC-1. Все полиамины стимулировали активность гуанилатциклазы и потенцировали ее активацию нитропруссидом натрия. Стимулирующие эффекты путресцина (и спермина) и НН были аддитивны; спермидин синергично усиливал аддитивный эффект. Все исследованные полиамины тормозили активацию фермента YC-1 и снижали синергичное увеличение НН-стимулированной активности гуанилатциклазы в присутствии YC-1 примерно с одинаковой интенсивностью. Выявленная способность использованных полиаминов потенцировать и синергично усиливать (аналогично YC-1, но менее эффективно) NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы указывает на новый биохимический эффект этих соединений, который необходимо принимать во внимание, особенно, учитывая эндогенную природу полиаминов. Полученные данные дают основание предположить, что специфические, биологические функции полиаминов в процессах роста и дифференциации клеток могут быть связаны также и со способностью соединений активировать растворимую гуанилатциклазу и повышать уровень cGMP.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, полиамины.

ВВЕДЕНИЕ. Эндогенный оксид азота (NO), идентичный эндотелиальному фактору релаксации (ЭДФР), образуется из L-аргинина под действием L-аргинин-NO-синтазы [1]. NO выполняет важные физиологические функции. Он является нейротрансмиттером [2], цитотоксическим агентом [3], мощным фактором гемостаза и рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилататор. Основным внутриклеточным рецептором оксида азота является растворимая гуанилатциклаза, катализирующая биосинтез циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (cGMP) - вторичного посредника, мощного регулятора метаболизма клетки, в значительной степени определяющего её функции [4]. Большинство эффектов оксида азота связано с активацией растворимой гуанилатциклазы и накоплением cGMP [4]. Последний опосредует широкий спектр физиологических эффектов NO, которые реализуются через взаимодействие со GMP специфическими cGMP-зависимыми протеинкиназами, ионными каналами и фосфодиэстеразой циклических нуклеотидов [5, 6]. Недавно выяснилось, что сигнальная система NO - растворимая гуанилатциклаза - cGMP,

выполняющая важные функции в центральной нервной системе, в процессах вазодилатации и гемостаза, участвует в регуляции пролиферативных процессов в клетке. Было показано, что аллостерический активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5'-оксиметил-2'-фурил)-бензил-индазол и проникающий в клетки аналог cGMP защищают клетки от апоптотических стимулов, а следовательно, и их гибели [7]. С другой стороны, ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (1-Н [1,2,4-оксадиазоло[4,3- α]хиноксалин-1) вызывает значительное усиление каспазной активности, ассоциирующей с потерей жизнеспособности клеток и снижением в них уровня cGMP [7]. Метиленовый синий (хорошо известный ингибитор NO-зависимой активации гуанилатциклазы) ингибирует рост лейкемических клеток линии L-1210 и P 388 [8]. Более того, было показано, что уровень cGMP в плазме нелеченых больных раком значительно выше чем у здоровых людей, и он нормализуется при ремиссии [9].

Таблица. Влияние путресцина (100 мкМ), спермидина (100 мкМ) и спермина (100 мкМ) на активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) тромбоцитов человека нитропруссидом натрия (НН, 10 мкМ), YC-1 (3 мкМ) и на синергизм активации фермента нитропруссидом натрия (10 мкМ) в присутствии YC-1 (3 мкМ).

Соединения и добавки	Стимулированная активность pГЦ (пмоль cGMP за мин на 1 мг белка)	Арифметическая сумма отдельных активностей	Влияние		
			путресцина (%)	спермидина (%)	спермина (%)
НН	+ 465 \pm 35				
путресцин	+ 20 \pm 1				
НН+ путресцин	+ 485 \pm 34	485 \pm 35	0		
спермидин	+ 91 \pm 3				
НН+ спермидин	+756 \pm 52	556 \pm 39		+36	
спермин	+ 61 \pm 5				
НН+ спермин	+528 \pm 38	526 \pm 37			0
YC-1	+111 \pm 8				
YC-1+ путресцин	+84 \pm 5	131 \pm 10	-36		
YC-1+ спермидин	+93 \pm 6	202 \pm 14		-54	
YC-1+ спермин	+91 \pm 5	172 \pm 13			-47
НН+YC-1	+1143 \pm 84	576 \pm 46			
НН+YC-1+ путресцин	+370 \pm 26		-68		
НН+YC-1+ спермидин	+334 \pm 27			-71	
НН +YC-1+ спермин	+408 \pm 26				-65

Примечание. Приведены средние величины из четырех независимых экспериментов (\pm средние стандартные отклонения). Базальная активность гуанилатциклазы составила 101 \pm 13 пмоль cGMP за 1 мин на 1 мг белка.

Другими словами, увеличение уровня сGMP может способствовать развитию пролиферативных процессов в клетке. Действительно, в литературе имеется достаточное количество данных, указывающих на определенную роль сGMP в пролиферативных процессах в клетке [7, 10-12]. Важную роль в процессах роста и деления клеток приписывают и полиаминам, которые, как было показано ранее [13], активировали растворимую гуанилатциклазу в клеточных культурах сердца и повышали уровень сGMP. Эти данные дают основание предположить участие сигнальной системы NO - растворимая гуанилатциклаза - сGMP в пролиферативных процессах в клетке и вовлечение этой системы в реализацию эффектов полиаминов. Поскольку специфические биологические функции полиаминов в процессах роста и деления клеток пока не установлены целью настоящей работы было исследование возможного влияния полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и на стимуляцию фермента NO-донором (нитропруссидом натрия) и NO-независимым аллостерическим активатором гуанилатциклазы YC-1. Как следует из результатов наших исследований, полиамины не только активировали гуанилатциклазу тромбоцитов человека, но и потенцировали (аналогично YC-1, но менее эффективно) стимуляцию фермента NO-донором.

МЕТОДИКА. В качестве источника растворимой гуанилатциклазы использовали тромбоциты человека. Тромбоциты выделяли из крови здоровых доноров как описано ранее [14]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 mM трис-HCl-буфере (pH 7,6), содержавшем 0,2 mM дитиотрейтол, озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE 5-78 (Великобритания) в течение 20 с и центрифугировали 1 ч при 105000 g. Супернатант суспензии тромбоцитов, полученной из 40 мл крови одного донора, использовали в качестве препарата растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека в одном эксперименте.

Активность гуанилатциклазы измеряли так же как описано в работе [15]. Пробы (общий объем 150 мкл) содержали 50 mM трис-HCl -буфер (pH 7,6), 1 mM GTP, 4 мкМ MgCl₂, 4 мкМ креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 мкМ теofilлина, 20 мкг супернатанта 105 000 g (по белку) и при необходимости другие добавки. При исследовании влияния полиаминов на базальную активность растворимой гуанилатциклазы и активацию фермента нитропруссидом натрия и YC-1 соединения растворяли в трис-HCl буфере (pH 7,6) и использовали в конечной концентрации 100 мкМ. Сначала соединения преинкубировали с ферментом (7 мин при 4°C), а затем к ним добавляли NO-донор (НН) или YC-1.

Количество образовавшегося за 15 мин при 37°C сGMP определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов отечественного производства для количественного определения сGMP. Белок определяли методом Bradford [16]. Использовали следующие реактивы: натриевая соль GTP ("Fluka", Швейцария) и остальные реактивы ("Sigma", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Путресцин, спермидин, спермин (в концентрации 100 мкМ) повышали базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека на 20, 91 и 61% соответственно (таблица). В концентрации 10 мкМ эти полиамины были менее активны. Путресцин, спермидин и спермин (100 мкМ) потенцировали стимуляцию гуанилатциклазы нитропруссидом натрия. Из данных таблицы видно, что при инкубации гуанилатциклазы с 10 мкМ нитропруссидом натрия без и в присутствии (по отдельности) путресцина, спермидина или спермина величины стимулированных активностей составляли 465±38, 485±34, 756±52 и 528±32 пмоль сGMP/мин/мг белка соответственно. При этом арифметические суммы двух активностей фермента, стимулированных (по отдельности) нитропруссидом натрия (10 мкМ) и каждым из использованных полиаминов (путресцином, спермидином или спермином, по 10 мкМ) составляли 485±35, 556±39, 526±37 пмоль сGMP/мин/мг белка, соответственно. Приведённые данные показывают, что стимулирующие эффекты нитропрussa натрия и путресцина (или спермина) были аддитивны, а спермидин синергично усиливал

аддитивный эффект до 136%. Это свидетельствует в пользу независимого действия полиаминов и нитропруссид натрия (по-видимому на два разных участка фермента).

Все использованные полиамины тормозили активацию гуанилатциклазы YC-1. Из таблицы видно, что при инкубации фермента с YC-1 (3 мкМ) без полиаминов и в присутствии путресцина, спермидина или спермина стимулированные активности гуанилатциклазы составляли 111 ± 8 , 84 ± 5 , 91 ± 5 и 93 ± 6 пмоль cGMP/ мин/ мг белка соответственно. Арифметические же суммы двух активностей фермента, стимулированных (по отдельности) YC-1 (3 мкМ) и каждым из полиаминов (путресцином, спермидином или спермином, по 100 мкМ), составляли 131 ± 10 , 202 ± 14 , 172 ± 13 пмоль cGMP/мин/ мг белка, соответственно, т.е. путресцин, спермидин и спермин тормозили активацию гуанилатциклазы YC-1 на 36%, 54% и 47% соответственно. Использованные полиамины тормозили также и синергичное усиление нитропруссидной активации гуанилатциклазы в присутствии YC-1. Стимулированные нитропруссидом натрия (10 мкМ) активности гуанилатциклазы, которые определяли без и в присутствии YC-1 (3 мкМ), составляли 465 ± 35 и 1143 ± 84 пмоль cGMP/ мин/ мг белка соответственно; т.е. YC-1 синергично усиливал нитропруссидную активацию фермента до 184%. Добавленные (по отдельности) путресцин, спермидин или спермин снижали эту активность с 1143 ± 84 до 370 ± 26 , 334 ± 26 , 408 ± 26 пмоль cGMP/ мин/ мг белка; т.е. тормозили синергичную активацию фермента на 68%, 71% и 65% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование влияния полиаминов (путресцина, спермидина, спермина) на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека и активацию фермента YC-1, а также на потенцирование последним стимуляции фермента нитропруссидом натрия, выявило сходство в действии этих соединений. Все использованные полиамины оказались активаторами фермента, увеличивая базальную активность последнего в 1,2, 1,9, 1,6 раза (с путресцином, спермидином и спермином соответственно). Эти соединения примерно одинаково тормозили активацию растворимой гуанилатциклазы YC-1, а также снижали увеличенную активацию фермента нитропруссидом натрия в присутствии YC-1. Использованные полиамины при инкубировании (по отдельности) с ферментом и нитропруссидом натрия потенцировали активацию гуанилатциклазы использованным NO-донором и вызывали аддитивный эффект. В опытах со спермидином наблюдалось даже синергичное усиление нитропруссидной активации до 136% (таблица). Эти данные показывают, что полиамины (по отдельности) и нитропруссид натрия, по-видимому, действуют независимо на два разных участка фермента. В таком случае, механизм активации гуанилатциклазы полиаминами является NO-независимым. Аддитивный эффект путресцина на активацию растворимой гуанилатциклазы нитропруссидом натрия был ранее показан в опытах с кардиомиоцитами из эмбрионов цыплят [17]. Способность полиаминов активировать растворимую гуанилатциклазу была продемонстрирована также и в культурах клеток сердца [13]. Механизм же стимуляции полиаминами активности этого фермента пока остается невыясненным. Было отмечено, что полиамины повышают сродство растворимой гуанилатциклазы к субстрату, также как и V_{\max} [13]. Более того, полиамины, по-видимому, могут замещать катион металла, являющегося кофактором фермента; т.е. взаимодействовать с катионным участком активного центра гуанилатциклазы. Интересно, что наибольшим сродством к катионному участку обладает спермидин [13]. Не исключено, что выявленная нами аддитивность стимулирующих эффектов путресцина и спермина при инкубации (по отдельности) с ферментом и нитропруссидом натрия и синергизм нитропруссидной активации гуанилатциклазы в присутствии спермидина (до 136%) обусловлены взаимодействием полиаминов с катионным участком активного центра фермента. Каков механизм торможения полиаминами активации растворимой гуанилатциклазы YC-1 и ингибирование ими синергичного усиления стимуляции фермента нитропруссидом натрия в присутствии YC-1 пока неизвестно. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Способность YC-1 повышать активацию растворимой гуанилатциклазы NO-донором и тем самым усиливать эффективность действия эндогенного NO и других NO-доноров имеет большое фармакотерапевтическое и физиологическое значение [18]. Использование соединений, аналогичных по своему действию YC-1, позволит снижать дозы нитровазодилаторов и других NO-доноров, а следовательно, уменьшать или устранять нежелательные побочные эффекты, например, развитие толерантности, возникающей при длительном применении органических нитратов [18]. Поэтому, в настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску и изучению свойств новых подобных YC-1 соединений, причем особое внимание уделяется веществам эндогенной природы [19]. С этой точки зрения выявленная нами способность эндогенных полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) потенцировать и синергично усиливать (по аналогии с YC-1, хотя и менее эффективно) NO-зависимую активацию растворимой гуанилатциклазы указывает на новый биохимический эффект этих соединений, который необходимо принимать во внимание. Кроме того, выявленная способность полиаминов повышать уровень cGMP влияя на активность растворимой гуанилатциклазы, даёт основание предположить, что специфические, биологические функции полиаминов в процессах роста и деления клеток могут быть связаны также и со способностью этих соединений активировать растворимую гуанилатциклазу и повышать уровень cGMP.

Исследования проведены при финансовой поддержки РФФИ (грант 05-04-48577)

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S.* (1988) *Nature*, **333**, 664-666.
2. *Knowles R.J., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S.* (1969) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5159-5162.
3. *Hibbs G.B., Tailor R.E., Vavrin Z.* (1987) *Science*, **235**, 473-476.
4. *Murad F.* (1994) *Adv. Pharmacol.*, **26**, 19-33.
5. *Hobbs A.J., Ignarro L.J.* (1996) *Methods Enzymol.*, **269**, 134-148.
6. *Hobbs A.J.* (1997) *Trends Pharmacol.Sci.*, **18**, 484-491.
7. *Flamigni F., Facchini A., Stanic I., Tantini B., Bonavita F., Stefanelli C.* (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 319-328.
8. *Lai B., Wang H., Zhan G., Tian G., Jao J., Liu J., Duan L., Pan J.* (1989) *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **11**, 98-100.
9. *Perachi M., Toschi V., Bamonti-Catena F., Lombardi L., Bareggi B., Catelezzi A., Colombi M., Maiore A.T., Polli E.E.* (1987) *Blood*, **69**, 1613-1616.
10. *Schmidt H.H.H.W., Lohman S.M., Walter U.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1178**, 153-175.
11. *Chawla R.K., Schlaer S.M., Lawson D.H., Murray T.G., Schmidt F., Shoji M., Nixon D.W., Richmond A., Rudman D.* (1980) *Cancer Res.*, **40**, 3915-3920.
12. *Morbidelli L., Chang Ch.-H., Douglas J.G., Granger H.J., Ziche M.* (1996) *Am. Physiolog. Soc.*, H411-H415.
13. *Clo C., Fantini B., Pignalli C., Guarnieri C., Caldarera C.M.* (1983) *Adv. Polyamine Res.*, **4**, 667-681.
14. *Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Балушкина Н.Н., Северина И.С.* (1987) *Биохимия*, **52**, 956-963.
15. *Garbers D.L., Murad F.* (1979) *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57-67.
16. *Bradford H.M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 246-254.
17. *Tantini B., Flamigni F., Pignalli C., Stefanelli C., Fattori M., Facchini A., Giordano E., Clo C., Caldarera C.M.* (2001) *Cardiovascular Res.*, **49**, 408-416.

-
18. *Rothermund L., Friebe A., Paul M., Roesling D., Kreutz R.* (2000) Br. J. Pharmacol., **130**, 205-208.
19. *Hobbs A.J.* (2002) Br. J. Pharmacol., **136**, 637-640.

Поступила: 13. 04. 2006.

POTENTIATION OF NO-DEPENDENT ACTIVATION OF SOLUBLE GUANYLATE
CYCLASE BY POLYAMINES

I.S. Severina, N.V. Pyatakova, A.Ya. Shchegolev

Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (495) 245-0857; e-mail: irina.severina@ibmc.msk.ru

The influence of polyamines (putrescine, spermidine, spermine) on the activity of human platelet soluble guanylate cyclase and stimulation of the enzyme by sodium nitroprusside, YC-1 and their combination was investigated. All polyamines used stimulated the guanylate cyclase activity and potentiated its activation by sodium nitroprusside. The stimulatory effects of sodium nitroprusside and putrescine (or spermine) were additive; spermidine produced a synergistic activation and increased the additive effect. All polyamines investigated inhibited the activation of the enzyme by YC-1 and decreased the synergistic activation of sodium nitroprusside-stimulated guanylate cyclase activity by YC-1 with approximately the same efficiency. The revealed ability of polyamines investigated to potentiate and synergistically increase (similar to YC-1, but less effective) NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase represents a new biochemical effect of these compounds, which should be taken into consideration, especially due to the endogenous nature of polyamines. The data obtained suggest, that the specific functions of polyamines in the processes of cell growth and differentiation may be also related to the ability of these compounds to activate soluble guanylate cyclase and increase cGMP level.

Key words: soluble guanylate cyclase, nitric oxide, polyamines.