

УДК 613.632.615. 36
© Коллектив авторов

УС-1-АНАЛОГИЧНОЕ ПОТЕНЦИРОВАНИЕ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ АДРЕНОХРОМОМ

И.С. Северина^{1}, Н.В. Пятакова¹, А.Ю. Щеголев¹, Т.А. Сидорова²*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; факс: (495)245-0857, эл. почта: irina.severina@ibmc.msk.ru

²ГУ Онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе 24.

Исследовано влияние адренохрома и УС-1 на активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека. Адренохром (0,1-10 мкМ) не влияет на базальную активность гуанилатциклазы, но потенцирует концентрационно-зависимым образом активацию фермента спермин наноатом (спермин NONO). Адренохром также повышает чувствительность гуанилатциклазы к оксиду азота (NO) и вызывает сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации спермин NONO. В присутствии УС-1 добавление адренохрома снижает аналогичный сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации спермин NONO. Адренохром тормозит активацию гуанилатциклазы УС-1. Таким образом, синергичная активация NO-стимулированной активности гуанилатциклазы адренохромом указывает на новый биохимический эффект адренохрома, который позволяет считать адренохром эндогенным регулятором NO-зависимой стимуляции растворимой гуанилатциклазы. Это новое свойство адренохрома, аналогичное УС-1 (но более эффективное), необходимо принимать во внимание, особенно в условиях гиперпродукции адренохрома в организме.

Ключевые слова: растворимая гуанилатциклаза, оксид азота, адренохром.

ВВЕДЕНИЕ. Адренохром образуется при внутриклеточном аутоокислении катехоламинов (адrenalина, норадреналина) супероксид анион радикалом (O_2^-) [1, 2]. O_2^- , образующийся первоначально при активации нейтрофилов и макрофагов, вызывает воспалительные процессы, сопровождающиеся повреждением тканей

* - адресат для переписки

и приводит к развитию септического шока [3]. При нормальных условиях образование O_2^- контролируется эндогенной супероксид дисмутазой (СОД). При патологических состояниях, связанных с воспалительными процессами, резко возрастает скорость образования O_2^- и защитная система эндогенной СОД не предотвращает накопления супероксид анион радикала. Это приводит к повреждению биологических макромолекул. Провоспалительные свойства O_2^- радикала вызывают повреждение клеток эндотелия, увеличение проницаемости сосудов [4], усиление перекисного окисления липидов, повреждение ДНК [5], освобождение цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкина- 1β) [6] и образование $ONOO^-$ - мощной цитотоксической молекулы [7]. Все эти нарушения ассоциируются с гипотензией, периферической вазодилатацией, резко сниженным ответом на агенты, регулирующие состояние сосудов [8]. Образующийся при аутоокислении адреналина адrenoхром тормозит действие катехоламинов и резко снижает их сосудосуживающие свойства. При этом падает артериальное давление и развивается септический шок [9]. Важная роль в возникновении септического шока принадлежит также и оксиду азота. Эндогенный NO, образующийся из L-аргинина под действием L-аргинин-NO-синтазы (eNOS) [10], рассматривается в настоящее время как эндогенный вазодилататор. В физиологических условиях освобождающийся NO вызывает вазодилатацию, регулирует тонус сосудов и кровяное давление [11, 12]. Основным внутриклеточным рецептором оксида азота и медиатором большинства его эффектов, включая вазодилатацию, является растворимая гуанилатциклаза. Фермент катализирует образование вторичного посредника циклического 3', 5'-гуанозинмонофосфата (cGMP) из GTP.

Гуанилатциклаза является гетеродимером, состоящим из α - и β -субъединиц [13]. Вазодилаторное действие NO связано с активацией растворимой гуанилатциклазы в результате взаимодействия NO с гемом гуанилатциклазы и образованием cGMP [14]. Последний активирует cGMP-зависимую протеинкиназу, а также Ca^{2+} -АТФазу, участвующих в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выходу Ca^{2+} из мышечных волокон и в конечном итоге к вазодилатации [15, 16]. При различных патологических состояниях (воспалительные процессы, инсульт) гиперпродукция цитокинов вызывает экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS), избыточное образование оксида азота, резкую активацию растворимой гуанилатциклазы и накопление cGMP. Септический шок, который сопровождается резким усилением NO-зависимой активации гуанилатциклазы, может быть также обусловлен повышением реактивности NO-cGMP-системы [17].

Взаимосвязь между адrenoхромом и NO практически не исследована. Мы нашли в литературе лишь одно указание о способности адrenoхрома активировать растворимую гуанилатциклазу почек кролика [18]. Однако, это было ещё до "рождения" внутриклеточной сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-cGMP. Образование адrenoхрома из адреналина под влиянием O_2^- радикала в условиях *in vivo* и *in vitro* происходит во внутриклеточных органелах: митохондриях и микросомах [19-21]. Следовательно, он может взаимодействовать с различными внутриклеточными белками в том числе и с растворимой гуанилатциклазой. Выяснение взаимосвязи между NO-cGMP сигнальной системой и адrenoхромом может способствовать более детальному пониманию роли адrenoхрома и оксида азота в регуляции сосудистого тонуса.

Целью настоящей работы было исследование влияния адrenoхрома на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека, на стимуляцию фермента NO-донором (спермин NONO) и на сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации спермина NONO в присутствии YC-1 (производного бензил индазола), являющегося NO-независимым активатором гуанилатциклазы, потенцирующим стимуляцию фермента NO-донорами.

Адренохром синергично усиливал стимуляцию растворимой гуанилатциклазы спермин NONO и снижал сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO в присутствии YC-1.

МЕТОДИКА. В качестве источника растворимой гуанилатциклазы использовали тромбоциты человека которые выделяли из крови здоровых доноров [22]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 mM трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащем 0,2 mM дитиотрейтол, озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE-78 (Великобритания) в течение 20 с и центрифугировали 1 ч при 105 000 g. Супернатант озвученной тромбоцитарной суспензии, полученный из 40 мл крови одного донора, использовали в качестве препарата растворимой гуанилатциклазы человека в одном эксперименте.

Активность гуанилатциклазы измеряли как описано в работе [23]. Пробы (общий объем 150 мкл) содержали 50 mM трис-HCl буфер (pH 7,6), 1 mM GTP, 4 mM MgCl₂, 4 mM креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 mM теofilлин, 20⁷ мкг супернатанта 105 000g (по белку) и при необходимости другие добавки. 10 mM концентрация теofilлина была достаточна для полного торможения активности фосфодиэстеразы тромбоцитов человека [22]. Влияние адренохрома исследовали в диапазоне его концентраций 0,1-10 мкМ. Адренохром сначала преинкубировали (10 мин. при 2°C) с гуанилатциклазой до добавления NO-донора. В качестве NO-донора использовали спермин NONO в диапазоне концентраций 1-40 мкМ. Из-за плохой растворимости адренохрома в буферном растворе его сначала растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) с последующим разведением в 50 mM трис-HCl буфере (pH 7,6) до требуемой концентрации. Контрольные пробы содержали то же количество ДМСО.

Количество образовавшегося cGMP (15 мин. 37°C) определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов для количественного определения cGMP (ООО “Медицина. Аналитика. Ветеринария”, Россия). Белок определяли по методу Bradford [24]. Использовали следующие реактивы: натриевая соль GTP, адренохром, спермин NONO, YC-1 [3-(5'-оксиметил-2'-фурил)-1-бензил индазол] (“Sigma”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Адренохром (0,1-10 мкМ) не влиял на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека. Рисунок 1 показывает, что адренохром потенцирует концентрационно-зависимым способом активацию растворимой гуанилатциклазы, индуцированную спермин NONO. Наиболее эффективно синергичное увеличение стимуляции гуанилатциклазы спермин NONO отмечено при концентрациях адренохрома 0,1 и 1,0 мкМ. Однако, следует отметить, что все использованные концентрации адренохрома повышали чувствительность гуанилатциклазы к NO и вызывали сдвиг влево кривой зависимости активации фермента от концентрации спермин NONO. Величины EC₅₀ для NO-донора (спермин NONO), полученные без и в присутствии 0,1, 1, 0 и 10 мкМ адренохрома, составляли 4,3, 1,25, 1,25 и 2,5 мкМ соответственно (более наглядная иллюстрация изменений EC₅₀ представлена на вставке в рис. 1, демонстрирующей % от максимальной активности). Известно, что YC-1 новый, NO-независимый активатор растворимой гуанилатциклазы [25], потенцирует активацию фермента NO-донорами. Основным действием YC-1 и родственных ему соединений является повышение чувствительности фермента к NO при его добавлении. Рисунок 2 показывает, что добавление YC-1 (3 мкМ) приводит к сдвигу влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO. В отсутствии и в присутствии 3 мкМ YC-1 величины EC₅₀ составляли 4,3 и 1,25 мкМ соответственно. Добавление адренохрома (10 мкМ) снижало этот сдвиг влево соответствующей кривой и увеличивало величину EC₅₀ до 4,25 мкМ (см. вставку в рис. 2).

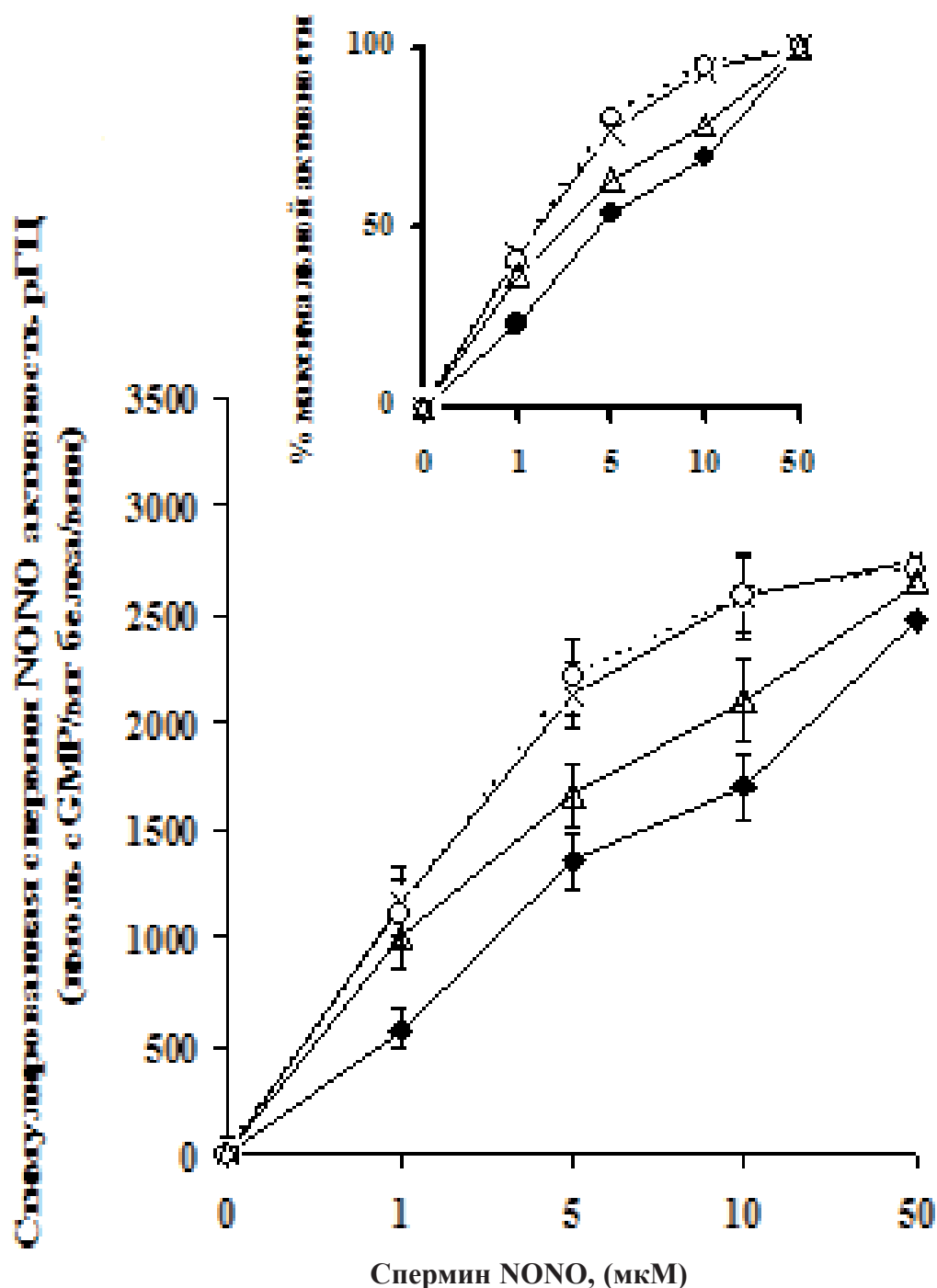


Рисунок 1.

Потенцирование индуцированной спермин NONO стимуляции растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека адrenoхромом. Увеличивающиеся концентрации NO-донора спермин NONO в отсутствии (·) и в присутствии 0,1 (x), 1,0 (o) или 10 (Δ) мкМ адrenoхрома. Ордината: стимулированная спермин NONO активность рГЦ (пмоль сGMP/ мг/ мин). Для более наглядной иллюстрации изменений величин EC_{50} вставка на рис.1 показывает % от максимальной активности. Базальная активность гуанилатциклазы равна 153 ± 11 (пмоль сGMP/мг/ мин). Приведены средние значения из 3-4 независимых экспериментов. (\pm средние стандартные отклонения)

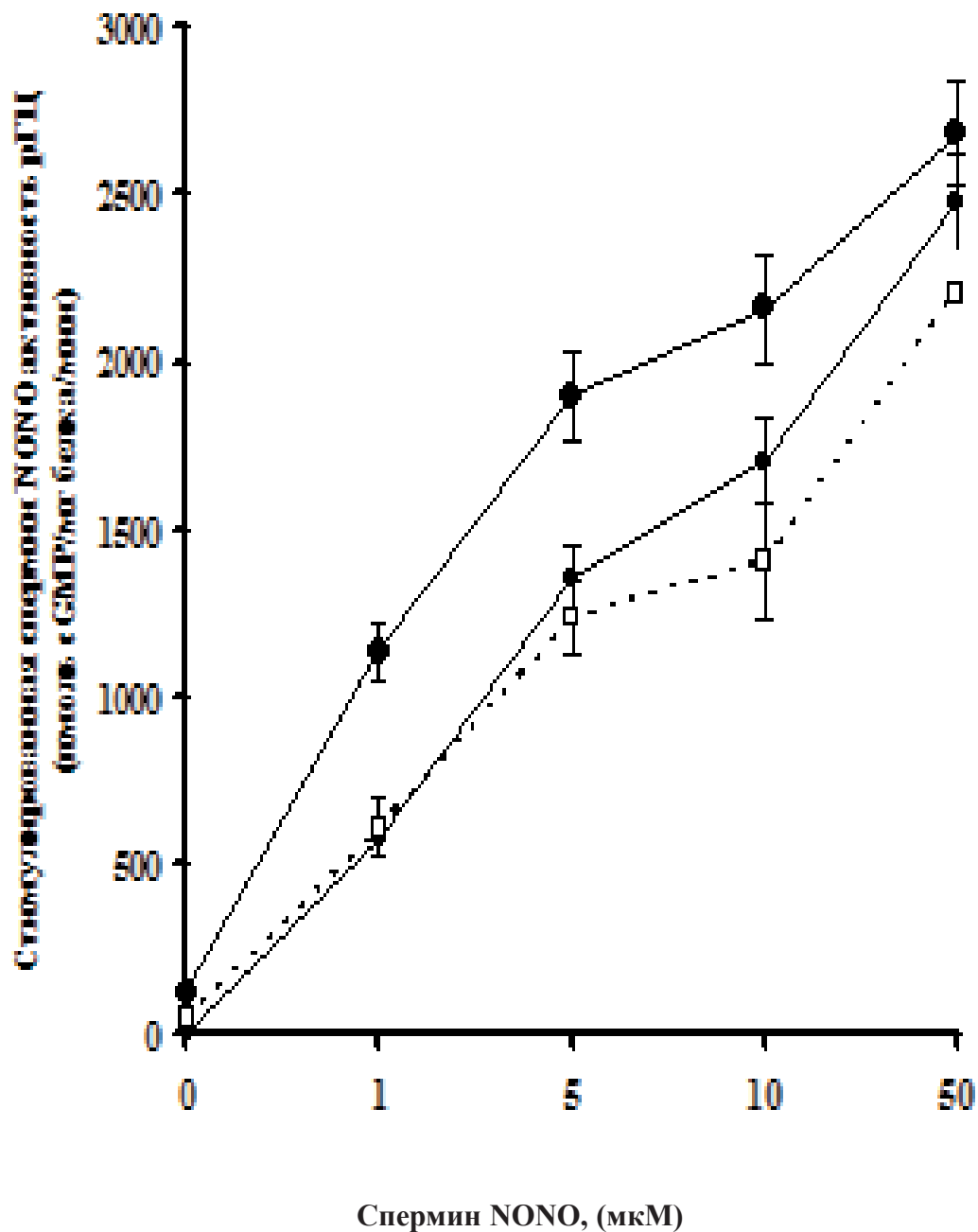


Рисунок 2.

Влияние адренохрома на потенцирование индуцированной спермин NONO активации растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека в присутствии YC-1. Увеличивающиеся концентрации NO-донора спермин NONO в присутствии (•) или в отсутствие (□) 3 мкМ YC-1 после добавления 10 мкМ адренохрома. Абсцисса: концентрации спермин NONO в пробе (мкМ). Ордината: стимулированная спермин NONO активность рГЦ (пмоль сGMP/мг/ мин). Для более наглядной иллюстрации изменений величин EC_{50} после добавления адренохрома вставка на рис. 2 показывает % от максимальной активности. Базальная активность гуанилатциклазы равна 153 ± 11 (пмоль сGMP/ мг/ мин). Приведены средние значения из 3-4 независимых экспериментов (\pm стандартные отклонения).

Таким образом, адrenoхром (аналогично YC-1) повышает чувствительность гуанилатциклазы к NO, т.е. вызывает сдвиг влево концентрационно-зависимой кривой активации фермента спермин NONO. Адrenoхром также снижает индуцированный добавлением YC-1 сдвиг влево кривой активации гуанилатциклазы от концентрации NO что указывает на возможные конкурентные отношения между адrenoхромом и YC-1. Возможность существования такой конкуренции подтверждается также торможением (на 63%) индуцированной YC-1 активации гуанилатциклазы при добавлении адrenoхрома. Стимулированная 3 мкМ YC-1 активация фермента до и после добавления 10 мкМ адrenoхрома составляла 122 и 45 пмоль cGMP/мин/мг белка соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ. Адrenoхром, образующийся при избыточной генерации O_2^- радикала, снижает или устраняет сосудосуживающий эффект экзогенно введенных катехоламинов (особенно, норадреналина), что приводит к резкому падению артериального давления [9]. Представленные данные впервые демонстрируют, что адrenoхром является эффективным стимулятором NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы. Он синергично усиливает вызванную спермин NONO активацию фермента. Это свойство адrenoхрома аналогично YC-1, но более эффективно. Известно, что основным действием YC-1 и родственных ему соединений, является повышение чувствительности гуанилатциклазы к NO, которое приводит к сдвигу влево кривой зависимости активации фермента от концентрации NO при добавлении YC-1. Тот же сдвиг влево концентрационно зависимой кривой спермин NONO мы показали после добавления увеличивающихся концентраций адrenoхрома (рис. 1) Ранее было постулировано, что механизм, лежащий в основе вызванного YC-1 потенцирования активации растворимой гуанилатциклазы NO-донорами, основан на связывании YC-1 с аллостерическим центром фермента [26, 27], расположенным в N-концевой части α_1 -субъединицы. Подобное взаимодействие повышает сродство NO к протетической гемовой группе фермента и снижает скорость диссоциации нитрозил-гемового комплекса. Это приводит к увеличению NO-стимулированной активности гуанилатциклазы [28]. Недавно, биохимический анализ подвергнутого направленному мутагенезу фермента выявил, что YC-1 увеличивает каталитическую активность, не только повышая сродство гуанилатциклазы к NO, но также и увеличивая эффективность его действия. При помощи направленного мутагенеза удалось разделить эффекты YC-1 на сродство NO к ферменту и эффективность действия NO. Было предположено, что YC-1 имеет по меньшей мере два типа взаимодействия с растворимой гуанилатциклазой. Предложенная авторами [29] структурная модель предполагает, что YC-1 ориентируется на одном псевдосимметричном GTP-связывающем участке двумя различными способами. Механизм выявленного нами синергичного действия адrenoхрома на активацию гуанилатциклазы спермин NONO неизвестен. В то же время, мы обнаружили конкурентные отношения между адrenoхромом и YC-1. В первом случае это когда адrenoхром (10 мкМ) тормозил (на 63%) активацию гуанилатциклазы YC-1 (3 мкМ) и во-втором, когда добавление адrenoхрома (10 мкМ) снижало индуцированный YC-1 (3 мкМ) сдвиг влево кривой зависимости активации гуанилатциклазы от концентрации спермин NONO (рис. 2). Эти результаты не исключают возможности взаимодействия адrenoхрома (по крайней мере частично) с тем же аллостерическим участком фермента, с которым взаимодействует YC-1. Однако, для доказательства этого необходимы дальнейшие исследования. Таким образом, представленные результаты о синергичном потенцировании активации гуанилатциклазы NO-донорами впервые демонстрируют новый биохимический эффект адrenoхрома. Адrenoхром не только снижает или устраняет сосудосуживающее действие адреналина и норадреналина [9], но и резко стимулирует активацию растворимой гуанилатциклазы NO-донорами. Это новое свойство адrenoхрома, аналогичное YC-1, показывает, что адrenoхром может действовать как эндогенный регулятор

НО-зависимой стимуляции растворимой гуанилатциклазы. Это следует принимать во внимание, особенно, в условиях избыточного образования адренохрома в организме и благодаря его эндогенной природе.

Исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-04-48577).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bindoli A., Deeble D.J., Rigobello M.P., Galzigna L.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1016**, 349-356.
2. *Bidoli A., Scutari G., Rigobello M.P.* (1990) *Neurotox. Res.*, **1**, 71-80.
3. *Lamarqu D., Whittle B.J* (1995) *Eur. J. Pharmacol.*, **277**, 187-194.
4. *Exspluges I.V., Whittel B.J.* (1989) *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 1085-1092.
5. *Dix T.A., Hess K.M., Medina M.A., Sullivan R.W., Tilly S.L., Webb T.L.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 4578-4583.
6. *Salvemini D., Wang Z.O., Atern M.G., Currie M.G., Misko T.P.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2659-2663.
7. *Volk T., Gerst J., Faust-Belbe G., Stoemann A., Kox W.J.* (1999) *Inflamm. Res.*, **48**, 544-549.
8. *Saffredini A.F., From R.E., Parker M.M., Brenner M., Kovags J.A., Wesley R.A., Parrilo J.E.* (1989) *N. Engl. Med.*, **321**, 280-287.
9. *Macarthure H., Westfall T.C., Riley D.P. Misko T.R., Salvemini D.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9753-9758.
10. *Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S.* (1988) *Nature*, **333**, 664-666.
11. *Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.* (1991) *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
12. *Ignarro L.J., Napoli G., Loscalzo J.* (2002) *Circ. Res.*, **90**, 21-28.
13. *Koglin M., Behrends S.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12590-12597.
14. *Denninger J.W., Marletta M.A.*, (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 344-350.
15. *Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S., Ruitz-Stewar, I., Park J., Schultz S., Chepenik K.P., Waldman S.A.* (2000) *Pharmacol. Rev.*, **52**, 375-413.
16. *Piriouchou A., Papapentropoulos A.* (2005) *Cell Signalling*, **17**, 407-413.
17. *Hobbs A.J.* (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 484-490.
18. *Liang C.T., Sacktor B.* (1978) *J. Cycl. Nucl. Res.*, **4**, 97-111.
19. *Laegreid W.W., Breeze R.G* (1985) *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.*, **47**, 387-397.
20. *Kong L. Jiang Q.G., Qu Qs.* (1989) *Biomed. Environ Sci.*, **2**, 72-77.
21. *Genova M.L., Abd-Eisalam N.M., Mahdy el S.M., Bernacchia A., Lucarini M., Pedulli G.F., Lenaz G.* (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **447**, 167-173.
22. *Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Белушкина Н.Н., Северина И.С.* (1987) *Биохимия*, **52**, 956-963.
23. *Garbers D.S., Murad F.* (1979) *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57-67.
24. *Bradford H.M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
25. *Mulsch A., Bauersachs J., Schafer A., Stasch J.P., Kast R., Busse R.* (1997) *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 681-689.
26. *Friebe A., Koesling D.* (1998) *Molecul. Pharmacol.*, **53**, 123-127.
27. *Friebe A., Russwurm M., Mergia E., Koesling D.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 15253-15257.
28. *Russwurm M., Mergia E., Mullerschausen F., Koesling D.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 24883-24888.
29. *Lamothe M., Fu-Jung Chang, Balashova N., Shirokov R., Beuve A.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 3039-3048.

Поступила: 24. 03. 2008.

YC-1-LIKE POTENTIATION OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT ACTIVATION
OF SOLUBLE GUANYLYL CYCLASE BY ADRENOCHROME

I.S. Severina¹, N.V. Pyatakova¹, A.Y. Shchegolev¹, T.A. Sidorova²

¹Orekhovich 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

²Blokhin Cancer Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoye Shosse, 24,
Moscow, 115478 Russia.

The influence of adrenochrome and YC-1 on spermine NONO-induced activation of human soluble guanylyl cyclase was investigated. Adrenochrome (0.1-10 μ M) had no effect on the basal activity, but it potentiated in concentration-dependent manner the spermine NONO-induced activation of this enzyme. Adrenochrome, like YC-1, sensitized guanylyl cyclase towards nitric oxide (NO) and produced the leftward shift of spermine NONO concentration response curve. Addition of adrenochrome decreased the YC-1-induced leftward shift of spermine NONO concentration response curve. Adrenochrome also inhibited (by 63%) the enzyme activation by YC-1. These data demonstrates the possible competition between adrenochrome and YC-1. Thus, synergistic activation of NO-stimulated guanylyl cyclase activity by adrenochrome represents a new biochemical effect of this compound and indicates that adrenochrome may act as an endogenous regulator of NO-dependent stimulation of soluble guanylyl cyclase. This new property of adrenochrome, similar to YC-1, is necessary taking into account, especially under conditions of overproduction of adrenochrome in organism.

Key words: guanylyl cyclase, nitric oxide (NO), adrenochrome.