

УДК 577.3: 612.111

## СПЕКТРЫ ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО АТФ

© 2009 Р.О. Кленов, Е.В. Чернова, Н.А. Кленова<sup>1</sup>

Исследованы спектры пептидных соединений в эритроцитах разного возраста при добавлении экзогенного АТФ в концентрациях 60-200 мкг/мл. Установлено, что экзогенный АТФ не изменяет спектра генерируемых пептидов, повышая лишь их количество при действии в концентрации 100-200 мкг/мл как на молодые, так и на старые клетки.

**Ключевые слова:** эритроциты, пептиды, АТФ.

### Введение

Многочисленные исследования конца прошлого века показывают, что очень широкий спектр функций организма высших животных и человека регулируется олигопептидами и пептидами. Пептидная система межклеточной сигнализации оказалась наиболее многочисленной, а сами пептидные регуляторы особенно полифункциональными [1]. Изучение взаимосвязанных механизмов пептидной регуляции стало основой появления концепции существования в организме непрерывной совокупности регуляторных пептидов, обеспечивающих стимуляцию или подавление любых процессов жизнедеятельности.

В настоящее время известно несколько классов регуляторных пептидных соединений, это – нейропептиды, пептиды иммунной системы, регуляторы процессов пищеварения, атриопептиды и другие. Пути их регуляторных эффектов достаточно пристально исследуются, построены физико-химические модели межмолекулярных взаимодействий пептидов с клетками, однако в литературе мало освещаются молекулярные механизмы их

---

<sup>1</sup>Кленов Роман Олегович, Чернова Екатерина Васильевна, Кленова Наталья Анатольевна (kln.ssu@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 43011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

внутриклеточного производства. Существует гипотеза В.Т. Иванова о специфическом пептидном пуле, который происходит из функционально активных высокомолекулярных белков путем тканеспецифичного ферментативного гидролиза этих белков до пептидов определенного размера [2]. Одним из таких белков-предшественников служит гемоглобин, для которого известно более 200 эндогенных пептидных соединений, получивших название гематиды. Они производятся различными клетками, а также обнаружены в эритроцитах [3].

Молекулярные механизмы внутриклеточного производства биологически активных фрагментов гемоглобина в эритроцитах недостаточно выяснены. Ранее нами были получены данные о зависимости уровня пептидных соединений от возраста клетки и активации адренорецепции. Установлено, что активация примембранного комплекса протеаз цАМФ является одним из условий увеличения скорости гидролитического расщепления гемоглобина [4].

Целью данного исследования стало изучение влияния экзогенного АТФ как предшественника цАМФ на скорость производства пептидов в разных возрастных фракциях эритроцитов человека.

## 1. Материалы и методы

Работа проводилась на эритроцитах крови человека, предоставленной Областной станцией переливания крови. Объектом исследования служила чистая фракция эритроцитов человека, разделенная по возрасту на молодые и старые клетки [5]. Чистоту фракций определяли, используя индекс фильтруемости эритроцитов [6] и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [7].

В пробы, содержавшие фракции эритроцитов, добавляли раствор АТФ в конечных концентрациях 60, 100 и 200 мкг/мл с 400 мкг/мл тритона для увеличения проницаемости мембраны. После перемешивания и 5-минутного выдерживания проб при комнатной температуре белки осаждали 10 % ТХУ, добавляя к суспензии эритроцитов в отношении 1:2, и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. В 0,2 мл надосадочной жидкости (ТХУ-экстракта) каждой пробы определяли содержание пептидных соединений по методу Лоури и при длине волны 254 нм. Измерение оптической плотности производили на спектрофотометре СФ-26.

По 0,5 мл экстракта каждой пробы фракции эритроцитов исследовали с помощью гель-хроматографии (колонка 8 × 190 мм, заполненная сефадексом G-10; 0,1M фосфатный буфер рН 6,86 в качестве подвижной фазы, скорость элюции 0,5 мл/мин). Детекцию проводили на СФ-26 при длине волны 254 нм. Результаты выражали в усл.ед. — ОП×1000.

Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента.

## 2. Результаты и их обсуждение

Полученные ранее данные свидетельствовали, что активность примембранного комплекса протеолитических ферментов в эритроцитах человека зависит от уровня производства цАМФ, так как содержание пептидных соединений увеличивалось в условиях активации бета-адренорецепции. Причем возможность активации в значительной степени зависела от возраста клеток и наиболее отчетливо обнаруживалась в молодых, функционально полноценных клетках. Так как предшественником цАМФ в клетках является АТФ, было интересным проанализировать, что в данном случае имеет первостепенное значение – состояние рецепторного аппарата и возможность проведения сигнала или уровень производства АТФ, то есть состояние метаболических систем клетки.

Верификация разделенных на фракции по возрасту эритроцитов показала, что молодые клетки отличались более высоким индексом фильтруемости и значительной активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что характеризовало их как функционально полноценные эритроциты (табл. 1) [8,9].

Таблица 1

**Индекс фильтруемости и активность  
глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы фракций молодых и старых  
эритроцитов человека**

Фракция эритроцитов	Индекс фильтруемости, %, $n = 15^*$	Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, $E^{**}$ /эрит. в мл гемолизата, $25^\circ C$ , $n = 7^*$	Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, $E^{**}$ /эрит. в мл гемолизата, $37^\circ C$ , $n = 7^*$
Молодые клетки	$83,2 \pm 5,0^{***}$	$1,278 \pm 0,032^{***}$	$2,830 \pm 0,142^{***}$
Старые клетки	$41,0 \pm 0,5$	$0,940 \pm 0,051$	$2,056 \pm 0,115$

*Примечания:* \* — указано количество фракций, выделенных из крови разных доноров; \*\* — E — международная единица активности ферментов; \*\*\* — достоверность различий  $p < 0,01$ .

Кратковременная инкубация проб эритроцитов разного возраста с АТФ в концентрациях 60, 100 и 200 мкг/мл показала, что уровень пептидных соединений, регистрируемых по методу Лоури, достоверно не повышается по отношению к контрольным пробам. Причем эффект не зависит ни от возраста клеток, ни от концентрации вводимого извне АТФ.

Мы предположили, что очень малое возможное увеличение количества пептидов не регистрируется из-за недостаточной чувствительности метода Лоури, показывающего лишь повышение уровня пептидных связей. Действительно, анализ проб на наличие поглощения при  $\lambda = 254$  нм позволил

обнаружить достоверное увеличение УФ-поглощения во фракциях молодых и старых клеток при добавлении АТФ в концентрации 100 и 200 мкг/мл (табл.2).

Таблица 2

**УФ-спектры поглощения ТХУ-экстрактами эритроцитов  
в условиях действия экзогенного АТФ (у.е.)**

Пробы	Контроль	60 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл
Фракция молодых эритроцитов	480 ± 44	576 ± 60	660 ± 47*	768 ± 55*
Фракция старых эритроцитов	588 ± 25	684 ± 41	792 ± 35**	876 ± 50**

*Примечания:* количество исследуемых фракций — 7, каждая имела по три повтора; \* — достоверность различия  $p < 0,05$ ; \*\* — достоверность различия  $p < 0,01$ .

Проведенная гель-хроматография проб обнаружила наличие одного узкого пика пептидных соединений средней молекулярной массы, величина которого повышается в зависимости от концентрации АТФ (см. рисунок).

Данные гель-хроматографии позволяют выявить лишь незначительные отличия в реакции разных по возрасту клеток на экзогенный АТФ, которые выражаются в отсутствии увеличения пика у старых клеток в ответ на введение АТФ в концентрации 100 мкг/мл, тогда как у молодых клеток он обнаруживается.

Анализ полученных данных позволяет с большой степенью достоверности утверждать, что производство биологически активных пептидов эритроцитами зависит прежде всего от наличия гормонального сигнала, а не от уровня АТФ в клетках. Полученные нами ранее данные хроматографии пептидных соединений, генерируемых в ответ на активацию бета-адренорецепции эритроцитов адреналином, свидетельствуют о наличии пика пептидов, присутствующего только в пробах с гормональным воздействием [10]. В пробах, содержащих адреналин, имелся пик, свидетельствующий о наличии пептидных соединений предположительно массой 700–1000 Да, тогда как общий пептидный фон, представленный во всех пробах, и при действии АТФ, вероятно, принадлежит пептидам массой более 1000 Да.

Таким образом, в концепцию производства биологически активных соединений пептидной природы в клетках путем гидролитического расщепления белковых предшественников можно включить наличие этапа акти-

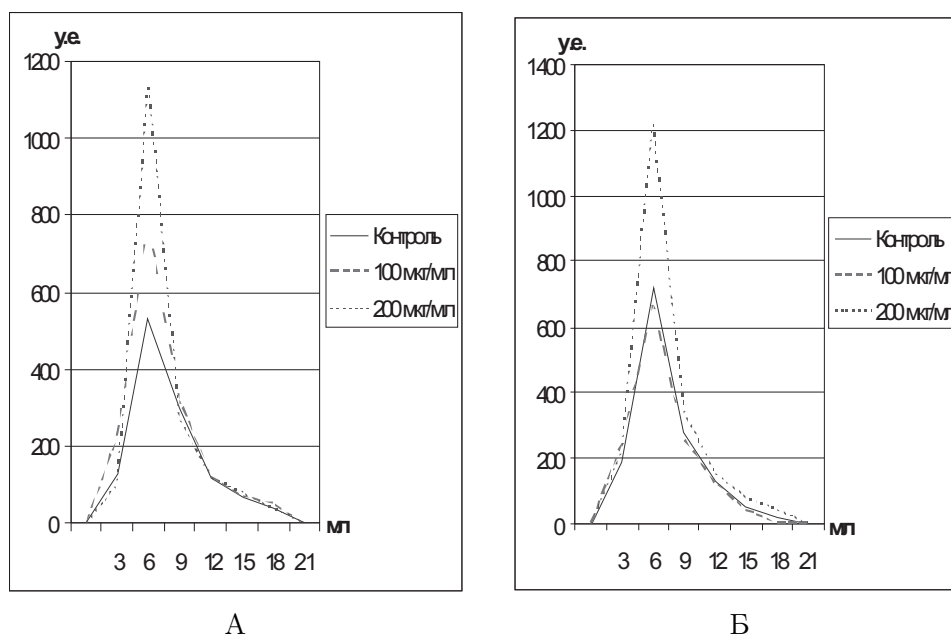


Рис. Гель-хроматография пептидных соединений, выделенных из фракции молодых (А) и старых (Б) эритроцитов при внесении экзогенного АТФ (у.е.)

вазии протеолитических ферментов с помощью предварительного сигнала, полученного клеткой извне.

## Литература

- [1] Шатаева, Л.К. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы) / Л.К. Шатаева, В.Х.Хавинсон, И.Ю. Ряднова — СПб.: Наука, 2003. — 222 с.
- [2] Ivanov, V.T. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool / V.T. Ivanov, A.A. Karelin, M.M. Philippova // Biopolimers (peptide Sci). — 1997. — V. 43. — №2. — P.171-188.
- [3] Карелин, А.А. Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов / А.А. Карелин, М.М. Филиппов, О.Н. Яцкий // Биоорганическая химия. — 1998. — Т.24. — №4. — С.271-281.
- [4] Кленова, Н.А. Механизмы генерации пептидов эритроцитами человека / Н.А. Кленова. Р.О. Кленов // Вестник СамГУ. — 2006. — №7. — С.75-79.
- [5] Варламова, С.В. Методы сепарации возрастных фракций эритроцитов / С.В. Варламова // Лаб. дело. — 1989. — №9. — С.32-35.
- [6] Tannert, T.C. Spreading of red cell blood suspensions on paper as simple test of cell deformability / T.C. Tannert, K. Lux // Acta biol.med germ. — 1981. — Bd.40. — P. 739-742.

- [7] Beutler, E. Clucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency / E. Beutler // Am.J.Clin. Pathol and Clin.med. — 1963. — 63(3). — P. 203.
- [8] Clarc, M.R. The Red Cell Production, Metabolism, Destruction / M.R. Clarc, N. Mohandas, S.B. Shohet // Blood. — 1983. — V.610. — P.899-910.
- [9] Зинчук, В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты / В.В. Зинчук // Усп. физиол. наук. — 2001. — Т.32. — №. 3. — С.66-78.
- [10] Кленова, Н.А. Механизм образования пептидных соединений в эритроцитах человека / Н.А. Кленова, Р.О. Кленов // Естествензнание и гуманизм. — 2006. — Т.3. — №4. — С.16-17.

Поступила в редакцию 2/II/2009;  
в окончательном варианте — 2/II/2009.

### SPECTRA OF PEPTIDES IN ERYTHROCYTES DIFFERENT BY AGE IN THE CONDITIONS OF EXOGENOUS ATP ACTION

© 2009 R.O. Klenov, E.V. Chernova, N.A. Klenova<sup>2</sup>

Spectra of peptides in erythrocytes different by age at addition of exogenous ATP in concentration of 60-200 mkg/ml are investigated. It is established, that exogenous ATP does not change a spectrum of generated peptides, raising only their quantity at action in concentration of 100-200 mkg/ml both on young and on old living cells.

**Key words and phrases:** erythrocytes, peptides, ATP.

Paper received 2/II/2008.

Paper accepted 2/II/2008.

---

<sup>2</sup>Klenova Nataliya Anatolievna (kln.ssu@rambler.ru), Chernova Ekaterina Vasilievna, Klenov Roman Olegovich, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.