

УДК 615.324.014.425:597.94:577.112.6

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГЛИКОПЕПТИДОВ КОЖНОГО СЕКРЕТА ГИГАНТСКОЙ КИТАЙСКОЙ САЛАМАНДРЫ

В. Лу¹, М. Ху², Ч. Тон³, Х. Джин¹, К. Ю¹, В. Ван¹, П.А. Лукьянов⁴¹Даляньский океанологический университет (г. Далянь, Ляонин, 116023, Китай),²Шеньянский сельскохозяйственный университет (г. Далянь, Ляонин, 116023, Китай),³Северо-восточный лесотехнический университет (г. Харбин, Хейлунцзян, 150040, Китай),⁴Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)**Ключевые слова:** китайская гигантская саламандра, гликопептиды, антиоксидантные свойства.

Кожный секрет китайской гигантской саламандры *Andrias davidianus* защищает животное от неблагоприятных условий окружающей среды, обеспечивая антиоксидантную устойчивость и защиту от ультрафиолетового излучения. Он предохраняет от бактериальной инфекции, обладает ранозаживляющим действием. Из кожного секрета китайской гигантской саламандры выделены гликопептиды с молекулярной массой 3,5 кДа и ниже. Они устойчивы к действию 0,1N соляной кислоты, трипсина и пепсина, легко проникают через стенку кишечника. Гликопептиды обладают выраженными антиоксидантными свойствами, нормализуют нитрооксидсинтазную активность клеток периферической крови человека, подавляют в них гиперпродукцию реактивных форм кислорода, являясь перспективными корректорами оксидантного стресса.

Китайская гигантская саламандра *Andrias davidianus* – самая большая амфибия в мире, достигающая в длину 2 метров и живущая до 100 лет. В неизменном состоянии этот вид существует последние 50 млн лет в провинции Хунань и прилегающих к ней областях Китая. Кожный мукосоподобный секрет защищает животное от неблагоприятных условий окружающей среды, обеспечивая антиоксидантную устойчивость, защиту кожных покровов от ультрафиолетового излучения [5]. Кроме того, секрет защищает раны от бактериальной инфекции, обладает ранозаживляющим действием и стимулирует клетки ткани раневой поверхности к пролиферации и дифференцировке. Он состоит из муциноподобного углеводно-белкового комплекса с включением различных низкомолекулярных соединений [2, 4]. Кожный секрет постоянно генерируется и сбрасывается животным в окружающую среду. При этом саламандры охотно поедают его. В Китае налажено фермерское воспроизводство саламандр как для сохранения генофонда, так и для пищевой промышленности. При культивировании взрослых особей с одного животного в течение года можно собрать до 500 г сухого мукуса. Биологические свойства этого уникального продукта и возможность получения новых терапевтических средств на его основе привлекли наше внимание.

Материал и методы. Гликопептиды получали после размораживания нативного секрета саламандр (10 г) гидролизом углеводно-белкового комплекса при pH 2 с использованием 30 мг кислой протеазы из *Aspergillus*

sp., полученной от Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province (Dalian, China) в течение 3 часов при 55 °С. После прогревания реакционной среды при 90 °С в течение 15 мин для инактивации фермента, охлаждения, нейтрализации и удаления высокомолекулярных соединений центрифугированием при 9000 об./мин в течение 30 мин гликопептиды как мажорный продукт выделяли с использованием ультрафильтрации между мембранами 5 и 1 кДа (выход 2,4 г). Молекулярную массу полученных гликопептидов определяли масс-спектрометрией на Bruker Autoflex time-of-flight mass spectrometer (Bruker, Germany). Аминокислотный анализ (без определения триптофана) проводили после гидролиза (1 мг/мл 6M HCl) при 100 °С в течение 24 часов с использованием анализатора Hitachi 835 (Japan).

Антиоксидантные свойства гликопептидов тестировались гашением радикалов [6]: 0,2 мл 0,2мМ 2,2-дифенил-1-пикрилгидраза в этаноле инкубировали 30 мин при комнатной температуре в присутствии различных концентраций гликопептидов, определяли падение оптической плотности (ОП) в процентах при 517 нм и рассчитывали гашение по формуле:

$$\text{ОП} = (\text{ОП}_{\text{бланк}} - \text{ОП}_{\text{образец}}) \times 100 / \text{ОП}_{\text{бланк}}$$

Антиоксидантные свойства также изучали на клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *Escherichia coli* (10 мкг/мл), исследуя подавление нитрооксидсинтазной активности и генерации реактивных форм кислорода по методам, описанным А.Д. Коряковой и др. [1].

Результаты исследования. Ферментативным гидролизом нативного муциноподобного секрета саламандр кислой протеазой с выходом 24 % были получены гликопептиды, по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии, с молекулярной массой 3,5 кДа и ниже (рис. 1). Препарат гликопептидов был хорошо растворим в воде и 75 %-ном этаноле (до 1 мг/мл), не изменял молекулярно-массового распределения при действии трипсина, пепсина и 0,1N HCl. Гликопептиды содержали в своем составе треонин, глутамин и глутаминовую кислоту, аспарагин и аспарагиновую кислоту, а также ароматические аминокислоты – фенилаланин и тирозин (табл.). Содержание углеводов, по данным фенол-сернокислотного анализа с глюкозой в качестве стандарта, составляет 17,6 %.

Лукьянов Павел Александрович – д-р хим. наук, профессор, ведущий лабораторией химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН; e-mail: paluk@mail.ru

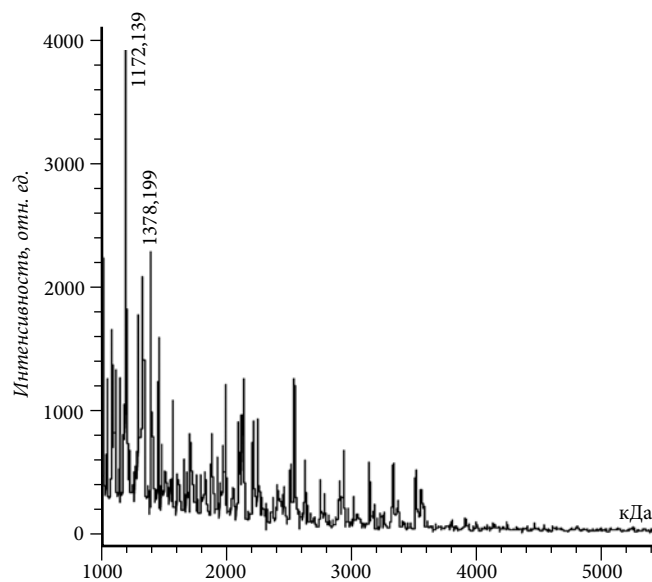


Рис. 1. Масс-спектрометрический анализ молекулярной массы гликопептидов саламандры.

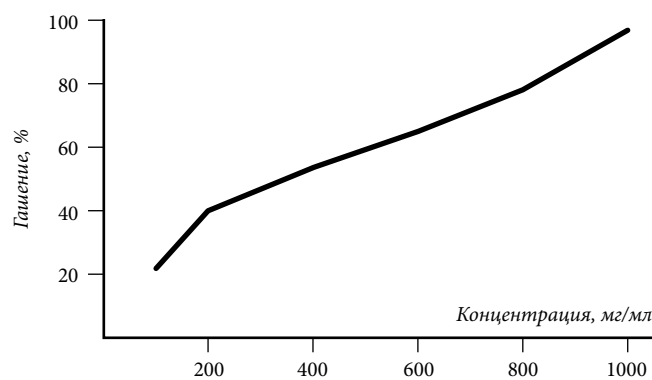


Рис. 2. Гашение радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина гликопептидами саламандры.

Гликопептиды вызвали гашение радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина [3] на 50 % при концентрации 300 мкг/мл (рис. 2). Кроме того, они были способны подавлять на 50 % гиперпродукцию реактивных форм кислорода и активность нитроксидсинтазы в клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *E. coli*, при концентрациях 125 и 250 мкг/мл соответственно (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Ферментативным гидролизом получены гликопептиды из мускуса саламандр с выходом 24 %. Их молекулярная масса оказалась меньше 3,5 кДа, и они устойчивы к ферментам пищеварительного тракта, что предполагает способность проникать сквозь стенку кишечника при пероральном применении в неизменном состоянии. Высокое содержание оксиаминокислот предполагает, что в основе структуры гликопептидов лежат О-гликозидные связи, кроме того, данные анализа бета-элиминирования подтверждают это. Содержание углеводов составляет 17,6 %, что характерно для муциноподобных гликопротеинов.

Гликопептиды эффективно гасят радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина и подавляют генерацию

Таблица
Аминокислотный состав гликопептидов

| Аминокислоты | % | Аминокислоты | % |
|--------------|------|--------------|-----|
| Аспарагинаты | 11,2 | Лейцин | 5,3 |
| Треонин | 13,1 | Тирозин | 3,1 |
| Серин | 0,2 | Фенилаланин | 4,7 |
| Глутаминаты | 12,5 | Гистидин | 2,6 |
| Пролин | 8,9 | Лизин | 5,3 |
| Глицин | 2,4 | Аргинин | 6,5 |
| Аланин | 8,5 | Метионин | 2,1 |
| Валин | 5,7 | Цистеин | 1,2 |
| Изолейцин | 3,6 | Триптофан | н/о |

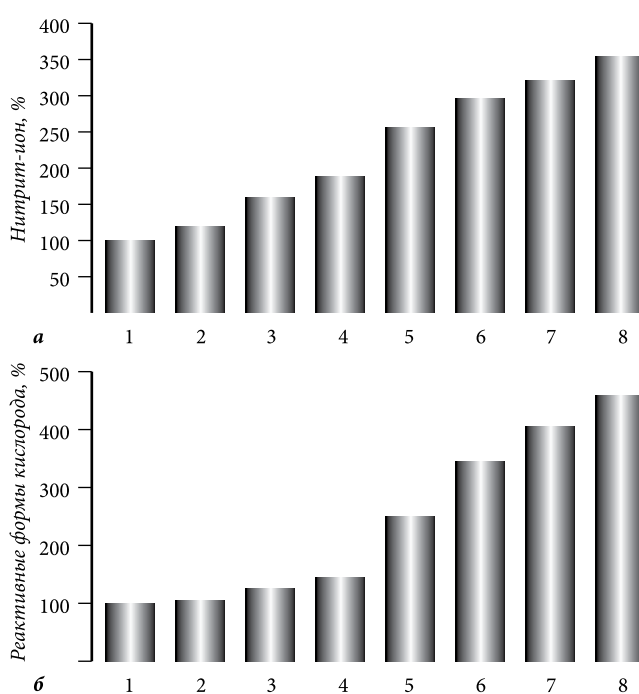


Рис. 3. Подавление нитроксидсинтазной активности (а) и генерации реактивных форм кислорода (б) гликопептидами в клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *E. coli* (10 мкг/мл):

1 – нативные клетки, 2–7 – 1000, 500, 250, 125, 63 и 32 мкг/мл гликопептидов соответственно, 8 – клетки, стимулированные липополисахаридом.

реактивных форм кислорода в гиперстимулированных клетках периферической крови человека, кроме того, они эффективно ингибируют в них нитроксидсинтазную активность. Совместная гиперактивация синтеза реактивных форм кислорода и нитроксидсинтазы приводит к синтезу пероксинитрила – чрезвычайно токсического интермедиата, вызывающего нитрирование ароматических аминокислот и дезактивирующего белки окружения.

Эти эффекты гликопептидов мускуса гигантской саламандры позволяют предположить, что они являются перспективными терапевтическими средствами, способными корректировать оксидантный статус и нитроксидсинтазную активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда NSFC-31071612, NSFC-21075012, Научного фонда Чжандзаде 2010ZD019 и Научного фонда провинции Хунань 2010FJ6096.

Литература

1. Корякова А.Г., Хоменко А.В., Лукьянов П.А. Роль сурфактантного протеина А в векторной доставке липосом к клеткам // Биологические мембраны. 2001. Т. 18, № 2. С. 131–136.
2. Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M., Nunes M.L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced // Process Biochemistry. 2010. Vol. 45. P. 18–24.
3. Jao C.L., Ko W.C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from Tuna cooking juice // Fisheries Science. 2002. Vol. 68. P. 430–435.
4. Kong L., Wu X., Luo B. et al. Glycopeptides isolated from skin glands secretion of *Andrias davidianus* // Glycobiology. 2010. Vol. 20. P. 1503–1509.
5. Lan S., Li D., Jiang J. Call and skin glands secretion induced by stimulation of midbrain in urodele (*Andrias davidianus*) // Brain Research. 1990. Vol. 528. P. 159–161.
6. Singh N., Rajini P.S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel // Food Chemistry. 2004. Vol. 85. P. 611–616.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CHINESE GIANT SALAMANDER SKIN SECRETION GLYCOPEPTIDES

W. Li¹, M. Qu², Ch. Tong³, Q. Jin¹, X. Yu¹, W. Wang¹, P.A. Lukyanov⁴

¹Dalian Ocean University (Dalian Liaoning 116023 China),

²Shenyang Agriculture University (Dalian Liaoning 116023 China),

³Northeast Forestry University (Harbin Heilongjiang 150040

China), ⁴Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far East Branch of Russian Academy of Science (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The skin secretion of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* protects the animal from unfavourable environmental conditions, thus ensuring antioxidative resistance and protection from ultraviolet light. It prevents from bacterial infections and has a vulnerary effect. The glycopeptides with molecular weight of 3.5 kDa and lower have been extracted from the Chinese giant salamander skin secretion. These are known to be resistant to 0.1 N of hydrochloric acid, trypsin and pepsin, easy to penetrate the intestinal wall. The glycopeptides have evident antioxidant properties, normalize nitroxide synthase activity of human peripheral blood, and suppress hyperproduction of reactive oxygen forms. It is very promising to treat oxidant stress.

Key words: Chinese giant salamander, glycopeptides, antioxidant properties.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 57–59.

УДК 577.114:612.112.91/94:95:612.017.11

ГЛИКОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АКТИВАТОРЫ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

Т.П. Смолина¹, Т.А. Кузнецова¹, Е.Л. Назаренко², Н.Н. Беседнова¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: лимфоциты, липополисахарид протеобактерий, моноциты, нейтрофилы.

Показано влияние липополисахарида (ЛПС), выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* штамма КММ156, и его структурных компонентов на активацию нейтрофилов, моноцитов и натуральных киллеров крови человека. Активацию клеток оценивали по изменению уровня экспрессии мембранных кластеров дифференцировки (CD) на поверхности натуральных киллеров (CD69 и CD25), на мембранах моноцитов и нейтрофилов (CD14 и CD16). ЛПС и его безлипидные компоненты оказывали активирующее действие на клеточное звено врожденного иммунитета. ЛПС вызывал шеддинг мембранных молекул CD14 с моноцитов и, по сравнению с контролем, значительно увеличивал популяцию клеток CD14⁺CD16⁺ с высоким уровнем эффекторных свойств и большим потенциалом антигенпредставляющей активности. О-специфический полисахарид и олигосахарид кора увеличивали популяцию моноцитов CD14⁺CD16⁺ в меньшей степени. Все гликополимеры, увеличивая экспрессию сигнальных молекул (CD14) и иммуноглобулинов (CD16) на нейтрофилах, приводили клетки к состоянию активации. На натуральных киллерах ЛПС в большей степени увеличивал экспрессию CD25 (пролиферативный потенциал клеток), а О-специфический полисахарид и олигосахарид кора – экспрессию CD69 (маркер цитотоксических функций).

Липополисахариды бактерий – сильные активаторы врожденного иммунитета – содержат токсический

компонент – липид А, что ограничивает их использование в качестве основы для получения лекарственных препаратов. В этом плане большой интерес представляют морские бактерии, относящиеся к роду *Pseudoalteromonas*, которые в силу особых условий обитания могут синтезировать необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом [3].

К настоящему времени биологически активные вещества, принадлежащие к различным классам соединений, обнаружены во многих видах морских бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Установлено, что в состав гликополимеров внешней мембраны грамотрицательных морских бактерий *Pseudoalteromonas* входят редкие и необычные N-ациламино- и кислые моносахариды, а также высшие сахара [1]. Ранее нами было установлено, что кислые капсульный и клеточные полисахариды морских микроорганизмов этого рода обладают способностью блокировать адгезию патогенных микроорганизмов на клетках животных и человека [5], а липополисахарид (ЛПС) и его компоненты, выделенные из бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, оказывают активирующее действие на мононуклеары клеток крови [6].

Цель настоящей работы – определение возможности активации клеток врожденного иммунитета

Смолина Татьяна Павловна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46, e-mail: tsmol@mail.ru