

ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА МЕТАЛНИ ЙОНИ ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА АМИНОПЕПТИДАЗА А В БЪБРЕК НА МИШКА – КОЛИЧЕСТВЕНА ИЗСЛЕДВАНЕ

Весела Петрова*, Машенка Димитрова*, Ивайло Иванов**, Величка Павлова*,
Надежда Стефанова***, Таня Топузова-Христова***

*Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей –
Българска академия на науките, 1113 София, България, vesi87@abv.bg

** Медицински университет, Медицински факултет, 1431 София, България, ivayloi@abv.bg

*** СУ „Св. Кл. Охридски“, Биологически факултет, 1164 София, България,
topouzova@biofac.uni-sofia.bg

Аминопептидаза А (АРА) е цинк-зависима металопептидаза, широко разпространена в органи и тъкани на бозайниците и човека. Ензимът има висока експресия в епителните клетки на извитите бъбречни каналчета, където взема участие в обработката на първичната урина. Известно е, че експресията на АРА се повишава при различни видове неопластични лезии на бъбреците. АРА се активира от Ca^{2+} йони. В настоящето изследване се оценява въздействието на други два алкалоземни метала (Sr^{2+} и Ba^{2+}) върху активността на ензима чрез биохимичен анализ на тъканни хомогенати от бъбрек на мишка. Според получените резултати Sr^{2+} активира АРА най-силно, по-слабо Ca^{2+} и най-слабо ензимът се активира от Ba^{2+} . Отсъствието на метални йони в инкубационната среда води до силно понижаване активността на ензима. Получените резултати имат съществено значение за изясняване механизмите на подтискане и активиране на АРА – ключов ензим за функционирането на бъбреците при бозайниците и човека.

ВЪВЕДЕНИЕ

АРА е мембранно-свързана аминопептидаза, която катализира отделянето на глутамова и аспартова киселина от аминокрая на полипептиди като Ангиотензин II, холецистокинин-8 и др.[6]. АРА се експресира най-силно в епитела на извитите бъбречни каналчета, епитела на тънките черва и ендотела на капилярите. В централната нервна система ензимът се експресира главно в ендотела на микрокапилярите в главния мозък[5]. Местата, на които се локализира в бъбреците, а също и в тънките черва, са богати на протеази[3]. АРА изпълнява алиментарна функция в тънките черва, а в бъбреците участва в обработката на първичната урина. Друга важна функция е участието в регулацията на кръвното налягане като превръща Ангиотензин II в Ангиотензин III. Инхибиторите на АРА са потенциални антихипертензивни средства [1]. Установена е свръхекспресия на ензима и в различни видове малигнени тумори, включително при карциноми на бъбрек [4]. АРА се активира от Ca^{2+} и се инхибира от хелатиращи агенти и йони на преходни метали[2].

Целта на настоящето изследване е да се оцени въздействието на други два алкалоземни метала - Sr^{2+} и Ba^{2+} върху активността на Аминопептидаза А.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Хистохимично изследване

Полово зрели BalbC мишки от двата пола бяха декапитирани под дълбока анестезия. Парчета от бъбреците бяха замразени в течен азот. Срезите с дебелина 10µm бяха нарязани на криотом Reichert-Jung (Germany) при -26°C. Срезите бяха покрити с 0,5 % целойдин за 1 минута на стайна температура. След това те бяха инкубирани в среда, съдържаща 0,5 mM субстрат 4-(α-глутамилхидразидо)-N-хексил-1,8-нафталимид и 0,5 mg/ml пиперонал в 0,1 M какодилатен буфер с рН 7.4, за 120 минути при 37°C. Към пробите бяха добавени и съответните метални йони в концентрация 1 mM, като една от пробите не съдържа метални йони. Срезите бяха пост-фиксиращи в 4 % неутрален формалин и бяха оцветени с

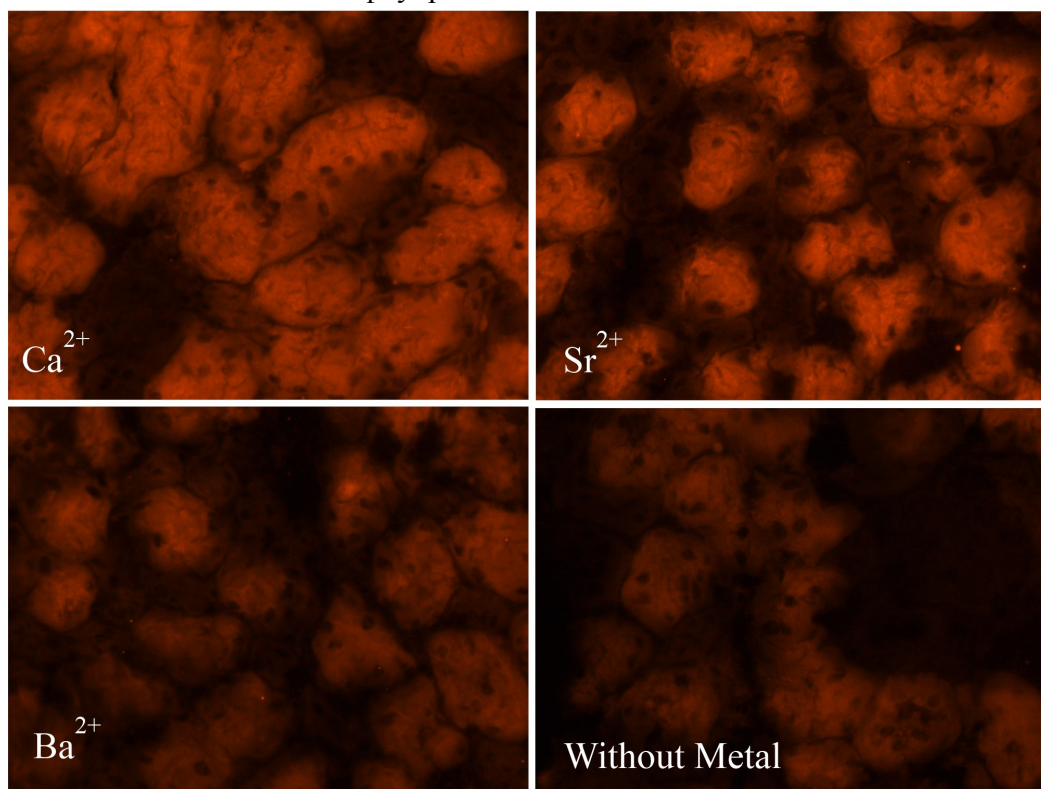
хематоксилин по класически хистологичен метод. Те бяха включени в среда глицерол/желатина и бяха изследвани под микроскоп Leica DM5000B (New York, USA).

Биохимичен анализ

Полово зрели BalbC мишки от двата пола бяха декапитирани под дълбока анестезия. Бъбреците бяха разделени на половина, като всяка половина беше хомогенизирана в хомогенизатор MSE (England) с 5 ml 0,1 M какодилатен буфер с рН 7.4 и 1 mM от съответните метални йони, като при четвъртата проба не бяха добавени метални йони. Получените хомогенати бяха центрофугирани за 20 min при 3000 rpm. След центрофугирането, към супернатантата бяха добавени 0,1 M какодилатен буфер със съответните йони, беше измерена абсорбцията на пробите при 260 и 280nm на спектрофотометър - Spekol 1500 (Analitjk, Jena) и белтъчното съдържание беше изчислено, както е описано от Dawson et al. (1991). Активността на АРА под действието на съответните метални йони беше измерена в инкубационни разтвори, съдържащи 0,5 mM субстрат α -глутамил-4-нитроанилид при 37°C. Аликвотите бяха отбирани през 15 минути, а реакцията беше стопирана с 3N HCl в съотношение 1 : 10 спрямо количеството на аликвотата. Абсорбцията на пробите беше измерена спектрофотометрично при дължина на вълната – 405 nm. За контрола беше използвана проба, която беше стопирана веднага след добавянето на субстрата. Зависимостта на отделеното количество реакционен продукт (4-нитроанилин) от времето беше определяна графически чрез програмата SigmaPlot 9.0. Активността на ензима беше определена посредством регресионен анализ.

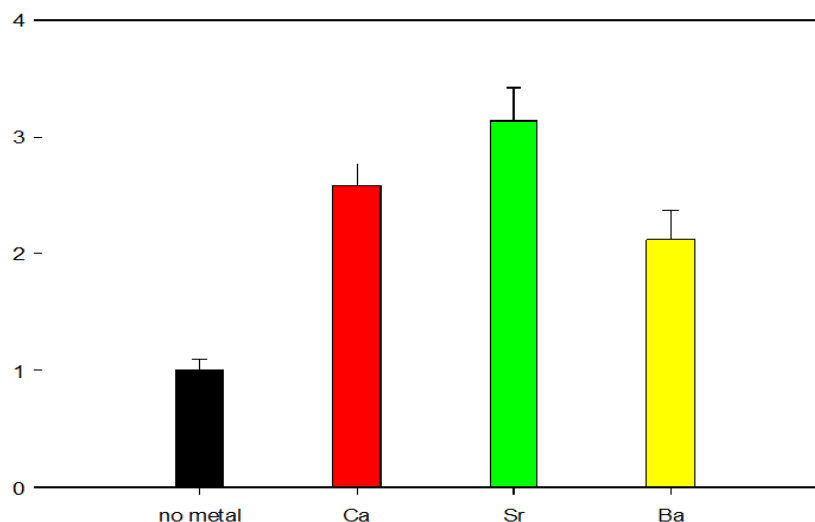
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ефектът, който наблюдавахме при криостатните срези от бъбрек (Фиг.1) показва, че АРА се активира силно от Ca^{2+} и Sr^{2+} , по слабо от Ba^{2+} , а при липса на метал се наблюдава съвсем слаба активност. Нивата на активност са оценени на полуколичествен принцип в зависимост от интензивността на флуоресцентно светене.



Фигура1. Активност на АРА в бъбрек от мишка. 400x

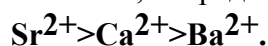
Резултатите, получени от биохимичния анализ на бъбречните хомогенати (Фиг.2) точно показват разликите в активирането на АРА под действието на различните метални йони. Става ясно, че Sr^{2+} най-силно активира АРА, по-слабо се активира от Ca^{2+} , и най-слаба активация се наблюдава с Ba^{2+} . Пробата с отсъствие на метални йони служи за контрола и се приема за единица, спрямо която са измерени останалите стойности.



Фигура2. Биохимичен анализ на нивата на активност на АРА

Хистохимичното изследване показва, че Ca^{2+} и Sr^{2+} активират почти в еднаква степен АРА, но по-точният биохимичен анализ показва, че ензимът се активира по-силно от Sr^{2+} и по-слабо от Ca^{2+} .

Досега се знаеше, че АРА се активира най-силно от Ca^{2+} , но нашите изследвания показват, че ензимът от бъбрек на мишка се активира по-силно от Sr^{2+} . Редът, по който се активира ензимът от различните метални йони, според получените резултати е следния:



На този етап от изследването не може да се определи дали този ред на активация в бъбрек на мишка се дължи на изоензим, който е по-чувствителен към Sr^{2+} отколкото към Ca^{2+} . Изясняването на този въпрос ще бъде обект на следващи наши изследвания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работата е финансирана от Европейския социален фонд и Република България, Оперативна програма "Развитие на човешките ресурси" 2007-2013 г., Договор No BG051PO001-3.3.06-0048 от 04.10.2012 г.

Тази работа е осъществена с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0059, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007-2013) и съфинансирана от Министерството на образованието и науката в Република България.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fournie-Zaluski, M.-C., C. Fassot, B. Valentin, D. Djordjijevic, A. Goazigo, P. Corvol, B. Roques, C. Llorens-Cortes, 2004 Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: A potential treatment of salt-dependent hypertension, PNAS, 7775-7780.

2. Tsujimoto, M., Y. Goto, M. Maruyama, A. Hattori, 2008 Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure, *Heart Fail Rev*, 13:285-291
3. Troyanovskaya, M., G. Jayaraman, L. Song, D. Healy, 2000 Aminopeptidase-A. I. cDNA cloning and expression and localization in rat tissues, *Am. Journal of Physiology*, 278:413-424.
4. Varona, A., L. Blanco, J. Lopez, J. Gil, E. Agirregoitia, J. Irazusta, G. Larrinaga, 2007 Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma, *Am. J. Physiology - Renal Physiology*, 292:780-788.
5. Vazeux, G., X. Iturrioz, P. Corvol, C. Llorens-Cortes, 1997 A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A, *Biochem. J.*, 327, 883-889.
6. Rozenfeld, R., X. Itturioz, M. Okada, B. Maigret, C. Llorens-Cortes, 2003 Identification of a New Residue, Glutamate 215, Involved in the Exopeptidase Specificity of Aminopeptidase A, *Biochemistry*, 42, 14785-14793.