

Д.О. Пашевін, С.В. Гончаров, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко

Зміни активності трипептидил-пептидази II у тканинах аорти при експериментальному атеросклерозі та артеріальній гіпертензії

Зміни активності внутрішньоклітинних протеолітичних систем – важлива ланка в механізмах атеросклеротичного пошкодження судинної стінки та артеріальної гіпертензії. Однією з маловивчених гігантських протеаз є трипептидил-пептидаза (ТПП) II, що забезпечує гідроліз пептидів, які утворюються після протеасомного протеолізу. В експериментах з моделювання холестеринового атеросклерозу у кролів (протягом 2 міс отримували корм зі 1%-м вмістом холестерину) встановлено суттєве зниження (на 64 %, $P < 0,05$) активності ТПП II у тканинах аорти. Показано, що холестеринова дієта зі спонтанною гіпертензією щурів також знижує активність досліджуваної протеази (на 50 %, $P < 0,05$), яка у щурів лінії Вістар не змінювалася. Застосування препаратів кверцетину запобігало пригніченню активності в тканинах аорти кролів при експериментальній гіперхолестеринемії та у щурів лінії SHR. Наші результати свідчать, що зміни активності ТПП II призводять до ушкодження судинної стінки при атеросклерозі та артеріальній гіпертензії. Ключові слова: трипептидил-пептидаза II, атеросклероз, артеріальна гіпертензія.

ВСТУП

Регуляція обміну внутрішньоклітинних протеїнів – один з ключових процесів у життєдіяльності клітини, а його порушення спричинює розвиток багатьох патологічних змін. Основною системою, що залучається до регуляції кількості та контролю якості білків клітини, є протеасомний протеоліз, що відзначається високою специфічністю відносно субстрату та швидкості його утилізації [1]. Протеасомна деградація є основним, але не єдиним фактором, що спричинює протеоліз, вона доповнюється так званими постпротеасомними протеазами, зокрема трипептидил-пептидазою II (ТПП II) [2–4]. Головна роль цієї гігантської протеази полягає у розрізанні на трипептиди тих залишків білка, що залишаються після протеасомного протеолізу, а за умов його порушення ТПП II може частково перебирати на себе функції протеасоми [5]. Крім цієї протеази, до про-

цесингу продуктів протеасомного протеолізу мають відношення й інші внутрішньоклітинні пептидази (LAP, TOP, BH, PSA), але тільки ТПП II здатна до деградації пептидів довжиною понад 15 амінокислотних залишків [3].

ТПП II – це серинова пептидаза, що складається з двох ланцюгів, які побудовані з ідентичних субодиниць (молекулярна маса 138 кДа), і, залежно від їх кількості, маса комплексу ТПП II може сягати 2000 кДа та навіть більше. Основна функція цієї протеази – відщеплення трипептидів від вільного NH_2 -кінця цитоплазматичних олігопептидів, що утворюються різними ендопептидазами та протеасомою. Крім власне завершення протеолізу білків-мішеней, ТПП II також бере участь і в підготовці до презентації пептидів у головному комплексі гістосумісності (ГКГС) I класу [4]. Нещодавно розпочаті дослідження ролі ТПП II у патогенезі різних захворювань. У культурах клітин тимоми та лімфоми EL4, що піддавали дії протеа-

© Д.О. Пашевін, С.В. Гончаров, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко

сомного інгібітора, з часом чутливість до його цитотоксичної дії знижувалася. Цей ефект пояснюють збільшенням активності ТПП II, що супроводжувала зниження цитотоксичного впливу [1]. При ушкодженні клітини іонізуючим випромінюванням H_2O_2 або ушкодженні мітохондрій відбувається транслокація з цитоплазми з накопиченням в ядрі ТПП II. Одночасно у ТПП-нокаутних тварин відзначалася підвищена чутливість до іонізуючого випромінювання [7]. Важливе значення також відводиться цій системі в механізмах м'язової дистрофії [8].

Мета нашого дослідження – визначити зміни активності ТПП II при експериментальному атеросклерозі та артеріальній гіпертензії.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на 28 кролях обох статей масою $2,95 \pm 0,35$ кг. Тварини були розділені на 3 групи. До I контрольної групи ввійшли 8 кролів, до II – 10 кролів, які щодня впродовж 8 тиж отримували корм зі вмістом холестерину (1 %), до III – 10 кролів, які паралельно з холестериновою дією отримували препарати кверцетину.

Інші дослідження проводили на щурах ліній Вістар масою 294 ± 22 г і SHR масою 294 ± 27 г, які були поділені на 5 груп: I – контрольна, щури лінії Вістар (n=8), II – щури лінії SHR (n=16), III – щури лінії Вістар, що отримували корм зі вмістом 3%-го холестерину (n=8), IV – щури лінії SHR, що перебували на раціоні з 3%-м вмістом холестерину (n=8), та V – щури лінії SHR (n=8), що отримували щодня таблетовану форму кверцетину – квертин протягом 8 тиж у дозі 15 г/кг. Квертин подрібнювали та домішували до стандартного корму, пресуючи гранули для згодовування щурам. Гіпертензію у щурів лінії SHR підтверджували вимірюванням тиску неінвазивним методом у хвостовій артерії за допомогою вимірювального комплексу сфігмоманометра S-2 («HSE», Німеччина).

Наявність та частоту пульсу реєстрували за допомогою осцилоскопа НМ303-4 («НАМЕГ GmbH», Німеччина). У дослід брали щурів із систолічним тиском понад 150 ± 3 мм рт.ст.

Мірою активності ТПП II була інтенсивність гідролізу специфічного флюорогенного субстрату, яку визначали на спектрофлюориметрі «Hitachi-4000» (довжина хвилі збудження/емісії (λ_x/λ_m) – 380/465). Для підтвердження специфічності гідролізу використовували селективний інгібітор. Відсоток зменшення активності гідролізу відповідних субстратів під дією вказаного інгібітора трактували як активність ТПП II і виражали в мікромолях амідометилкумарину на 1 мг білка за 1 хв.

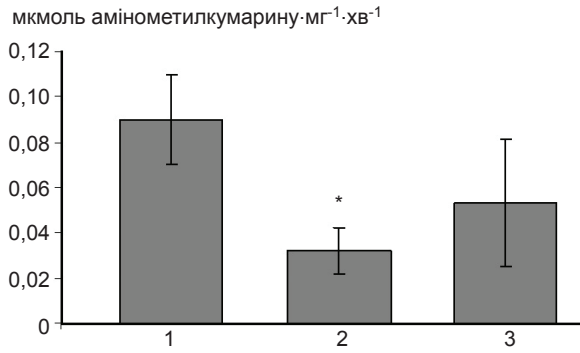
Для дослідження активності ТПП II у тканинах тварин піддавали евтаназії за допомогою повітряної емболії (кролі) та декапітації під уретановим наркозом (щури). Аорту подрібнювали в скляному гомогенізаторі в тріс-НСІ-буфері (рН 7,4), центрифугували (900 г протягом 10 хв), а супернатант використовували для біохімічного дослідження. Вміст білка в гомогенатах аорти визначали за методом Lowry [6]. Активність протеази виражали в мікромолях амідометилкумарину на 1 мг білка за 1 хв. Флюорогенні субстрати та інгібітори, виготовлені фірмою «Sigma» (США).

Отримані результати обробляли математично з використанням комп'ютерних програм Origin 7.0 і Excel. Достовірність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про суттєвий вплив гіперхолестеринової дієти на активність ТПП II в тканинах аорти кролів, яка знижувалася на 64 % порівняно з контролем ($P < 0,05$). Введення препаратів кверцетину припиняло холестериніндуковане зниження цього показника (рис 1).

Подібні результати спостерігались і при моделюванні холестеринозу у щурів зі спон-



Зміни активності трипептидил-пептидази II в тканинах аорти кролів при моделюванні холестеринного атеросклерозу та впливу кверцетину: 1 – контроль, 2 – дієта зі вмістом холестерину (1%), 3 – холестеринова дієта і вплив кверцетину. *P<0,05 порівняно з контролем

танною гіпертензією. Активність ТПП II у контрольних та у дослідних щурів не відрізнялася. Проте 8 тиж холестеринної дієти практично не змінювали її у щурів лінії Вістар, але у SHR-групи вона значно знижувала активність (на 50%) порівняно з досліджуваними тваринами, які не перебували на дієті. Вплив кверцетину попереджував зниження активності ТПП II у щурів лінії SHR (на 35% порівняно з SHR без лікування).

Зміни активності ТПП II в тканинах аорти щурів зі спонтанною гіпертензією при моделюванні холестеринного атеросклерозу та впливу кверцетину:

Щури лінії Вістар	0,0257 ± 0,009
Щури лінії Вістар, що перебували на 3%-й холестеринній дієті	0,0212 ± 0,009
Щури зі спонтанною гіпертензією	0,0258 ± 0,011
Щури зі спонтанною гіпертензією, що перебували на 3%-й холестеринній дієті	0,013 ± 0,008*
Щури зі спонтанною гіпертензією, яким згодовували кверцетин	0,017 ± 0,007

*P<0,05 порівняно з групою 3.

Дані наших попередніх досліджень вказують на те, що атеросклеротичні зміни су-

проводжуються підвищенням протеасомної активності у тканинах аорти та лейкоцитах крові [10], а згідно з результатами цього дослідження активність ТПП II знижувалась як у кролів, так і у щурів зі спонтанною гіпертензією за умов гіперхолестеринемії. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що такий дисбаланс у системі утилізації внутрішньоклітинних протеїнів між протеасомою і ТПП II є однією з ланок патогенезу атеросклеротичного процесу. Водночас слід зазначити, що конкретна роль такої невідповідності у механізмах атерогенезу не визначена. Найбільш вірогідним наслідком такої ситуації має бути накопичення в клітинах олігопептидів, що не зазнали «тримінгу» за допомогою ТПП II. Це може провокувати зміну профілю пептидів, що презентуються в складі ГКГС I на клітинній стінці та кількість комплексів гістосумісності, що презентуються на мембрані [11]. Таке явище в свою чергу викличе аутоімунне ушкодження, значення якого в атеросклерозі добре вивчено [1, 12]. Іншим відомим фактором ушкодження судинної стінки є оксидативний стрес. Дослідження Preta та співавт. [3, 13] свідчать, що ушкодження ДНК супроводжуються транслокацією ТПП II в ядро, і автори вважають, що це має значення у ДНК-репарації (в тому числі і за умов оксидативного стресу) [3]. Якщо дотримуватися такої точки зору, то зниження активності ТПП II у клітинах судинної стінки при атеросклеротичному процесі повинно підвищувати чутливість ДНК до структурних порушень і зменшувати антиоксидантний захист клітин.

Також добре відомо, що атеросклероз є асоційованою з віком патологією. Нуаї та співавт. [4] показали, що у мишей, нокаутуваних за геном ТПП II, відбувається активація програм клітинної смерті, асоційована з фенотипом «імуностаріння». Ознаки передчасного старіння у ТПП II-дефіцитних мишей найбільш яскраво виражені у фібробластах та CD-8 Т-лімфоцитах. Автори наголошують на роль у цьому процесі пошкодження

ДНК, індукованого вільними радикалами [14]. Про участь досліджуваної протеази в механізмах ДНК-репарації вказувалося вище [13]. Отже, зниження активності ТРР II в аорті кролів, а також щурів лінії SHR за умов гіперхолестеринемії опосередковано свідчить про передчасне старіння клітин аорти. Варто додатково нагадати, що саме у кролів та у щурів лінії SHR, що перебували на гіперхолестериновій дієті, були ознаки атерогенезу. Більше того, при нокауті ТПП II спостерігається хронічне запалення на тлі імунodefіциту [14]. Проявами цього була інфільтрація печінки лімфоцитами, зрілими гранулоцитами, а також підвищення NFκB в ізольованих спленоцитах, що характерно для вікових змін в імунній системі. Одночасно роль запалення як принципового механізму концепції «відповідь на ушкодження» в атерогенезі нині вважається ключовою та доведена багатьма дослідженнями [15–17]. Про участь ТПП II в цьому процесі практично нічого не відомо. Ми вперше встановили зменшення активності згаданого фермента у кролів і щурів з експериментальним атеросклерозом та показали, що ангіопротективний препарат кверцетин запобігає його зниженню і одночасно перешкоджає розвитку атеросклерозу. Можливим механізмом впливу кверцетину на активність ТПП II може бути його здатність до пригнічення протеасомного протеолізу [10]. За нашими результатами, інтерференція однієї з субодиниць протеасоми підвищувала активність ТПП II в тканинах серця [18]. Таким чином, ця реакція може розглядатися як компенсація підвищення активності протеасоми, що узгоджується з результатами інших дослідників [1]. Отже, нами встановлено значення ТПП II при експериментальному атеросклерозі та доведено, що ангіопротективний ефект кверцетину включає попередження зменшення ТПП II залежного протеолізу в аорті кролів і щурів при експериментальній гіперхолестеринемії. Наші результати вперше піднімають питання про значення гігантської протеази ТПП II у судинній патології.

**Д.А. Пашевин, С.В. Гончаров,
Л.В. Тумановская, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко**

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТРИПЕПТИДИЛ-ПЕПТИДАЗИ II В ТКАНЯХ АОРТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Изменения активности внутриклеточных протеолитических систем – являются важным звеном в механизмах атеросклеротического повреждения сосудистой стенки, а также в патогенезе артериальной гипертензии. Нами изучалась одна из гигантских пептидил-пептидаза (ТПП II), которая обеспечивает гидролиз пептидов, образующихся после протеасомного протеолиза. В экспериментах по моделированию холестеринового атеросклероза у кроликов (на протяжении 2 мес получали корм с содержанием холестерина (1 %) установлено значительное снижение (на 60 %, $P < 0,05$) активности ТПП II в тканях аорты. Также показано, что холестериновая диета крыс со спонтанной гипертензией также снижает активность ТПП II (на 50 %, $P < 0,05$), которая у крыс линии Вистар при этом не изменялась. Применение препаратов кверцетина предотвращало угнетение активности ТПП II в тканях аорты кроликов при экспериментальной гиперхолестеринемии и у крыс со спонтанной гипертензией. Эти результаты свидетельствуют о том, что изменения активности этого фермента ведут к повреждению сосудистой стенки при атеросклерозе и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: трипептидил-пептидаза II, атеросклероз, артериальная гипертензия.

**D.O. Pashevin, S.V.Goncharov, L.V. Tumanovska,
V.E. Dosenko, O.O. Moibenko**

THE CHANGES IN THE ACTIVITY OF TRIPEPTIDYL PEPTIDASE II IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS AND HYPERTENSION

The changes in the activity of intracellular proteolytic systems are important mechanisms in the damage of blood vessels walls and arterial hypertension. Tripeptidyl peptidase II (TPP II) is one of the giant intracellular protease that is still poorly known. It fulfils hydrolysis of peptides, coming from proteasomal proteolysis. Modeling of cholesterol atherosclerosis in rabbits (1 % of cholesterol in diet for 2 month) results in the significant decrease of TPP II activity in aorta tissues. This diet in spontaneously hypertensive rats (SHR) leads to a decrease of TPP II activity in aorta tissues (on 50%, $P < 0,05$) but has no influence on the activity of TPP II in Wistar rats. Application of Quercetin prevents the inhibition of TPP II activity in aorta tissues of rabbits and SHR at experimental hypercholesterolemia. The data received show that changes in the activity of TPP II play

an important role in pathogenesis of blood vessels wall in atherosclerosis and arterial hypertension.

Key words: Tripeptidyl peptidase II, cholesterol atherosclerosis, arterial hypertension.

Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Powell S.R., Herrmann J., Lerman A. The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease // *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 109; 295-346.
2. Zhang J., Wong J., Gao G. Tripeptidyl peptidase II serves as an alternative to impaired proteasome to maintain viral growth in the host cells. *H. FEBS Lett.* 2011; 585(1); 261-5.
3. Rockel B., Kopec K., Lupas A. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 24; 237-45
4. Preta G., de Klark R., Gavioli R. The Enigma of Tripeptidyl-Peptidase II: Dual Roles in Housekeeping and Stress. *J. Oncol.* 2010;
5. Glas R., Bogyo M., McMaster J.S. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature.* 1998; 392;618-22.
6. van Endert P. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(99); 1553-67.
7. Preta G, de Klark R, Glas R. Arole for nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in reactive oxygen species-dependent DNA damage responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 389(4); 575-9.
8. Wray C.J., Tomkinson B., Robb B.W. Tripeptidyl-peptidase II expression and activity are increased in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296; 41-7.
9. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; (193); 265-275.
10. Pashevin D.O., Tumanovska L.V., Dosenko V.E. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes // *Pharmacol Rep.* 201; 63(4); 1009-18.
11. Reits E., Neijssen J., Herberts C. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation // *J Immunity.* 2004; 20(4); 495-506.
12. Grundtman C., Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis // *Curr Opin Lipidol.* 2011; 22(5); 327-34.
13. Preta G., de Klark R., Chakraborti S. MAP kinase-signaling controls nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in response to DNA damage and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 27; 324-30.
14. Huai J., Firat E., Nil A. Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPPII knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(13); 5177-82.
15. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(10); 709-21.
16. Rohla M., Weiss T.W. Metabolic syndrome, inflammation and atherothrombosis . *Hamostaseologie;* 2013; 34 (1); 283-94.
17. Woollard K.J. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clin Sci. (Lond).* 2013; 125(5); 221-35.
18. Kyrychenko VO, Nagibin VS, Tumanovska LV. Knockdown of PSMB7 Induces Autophagy in Cardiomyocyte Cultures: Possible Role in Endoplasmic Reticulum Stress . *Pathobiology.* 2014; 81(1);8-14
19. Geier E., Pfeifer G., Wilm M. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science.* 1999; 283;978-81.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: den-win@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 11.11.2013