

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՍՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԵՐԱՆՈՍՅԱՆ ԼՈՒԻԶԱ ԱՇՈՏՆԻ

**ՆԵՅՐՈՊԵՊՏԻԴ PRP-1-Ի ԴԵՐՈՂ ԱՇԽԱԶՐԱՖՈՏՈՂՈՒՄՅԱՆ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԳՈՐԾՈՒՄ**

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների
թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսությունը

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2014

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ЕРАНОСЯН ЛУИЗА АШОТОВНА

**РОЛЬ НЕЙРОПЕПТИДА ПЫП-1 В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ
УГЛЕВОДНО-ФОСФОРНОГО ОБМЕНА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.04 – “Биохимия”

ЕРЕВАН – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում՝

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկն. Լ.Պ. Տեր-Թադևոսյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Ս.Ս. Մարդանյան
կենս. գիտ. թեկն. Լ.Ս. Հովսեփյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ պրոֆ. Ռ.Օ. Յոլյանի անվան արյունաբանական կենտրոն

Պաշպանությունը կայանալու է 2014թ. օգոստոսի 11-ին, ժամը 14:00 -ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (Երևան, 0014, Հասարակության փ., 7) :

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և www.molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2014թ. հուլիսին 11-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.



Գ.Ս.Մկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

Научный руководитель: канд. биол. наук, Л.П. Тер-Гадевосян

Официальные оппоненты : докт. биол. наук, С.С. Мардарян
канд. биол. наук, Л.М. Овсепян

Ведущая организация: Гематологического центра
имени профессора Р.О. Еоляна

Защита состоится 11 августа 2014г. в 14:00 часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте www.molbiol.sci.am.

Автореферат разослан 11 июля 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук

Г.М. Мкртчян



Актуальность темы. В настоящее время трудно оспаривать тот факт, что в основе любого патологического процесса лежат нарушения координированной деятельности определенной ферментной системы. По-видимому, направленное изучение ферментативных систем больного организма позволит найти пути их регуляции и в необходимой мере реконструировать механизмы, участвующие в поддержании динамического равновесия данной ферментной системы. Ферменты углеводно-фосфорного обмена по праву относятся к числу самых распространенных систем, осуществляющих в организме важную физиологическую функцию. Они участвуют в биохимических реакциях обмена веществ, в процессах фосфорилирования-дефосфорилирования, трансфосфорилирования. Особое место в этих процессах занимают фосфомоноэстеразы: пирогосфатаза (ПФ), кислая и щелочная фосфатазы (КФ и ЩФ). Функция этих ферментов состоит в поддержании концентрации фосфора, необходимого для различных биохимических процессов [Fishman W., 1992; Moss D., 1997]. Биологическое значение этой группы ферментов связано с обменом нуклеопротеидов, жиров, гликогена, с процессами гликогеногенеза и регенерации, а также с эмбриогенезом. Фосфомоноэстеразы способны дефосфорилировать НАДФ + и НАДФ•Н [Schmid F. et al., 2012] и косвенно влиять на направление и интенсивность многих окислительно-восстановительных процессов в клетке. На основании электронно-микроскопических исследований щелочная фосфатаза была отнесена к группе мембранных ферментов, функции которых связаны с процессами, протекающими в мембранах. Роль неорганической пирогосфатазы в метаболизме заключается прежде всего в регуляции процессов биосинтеза, протекающих с образованием неорганического пирогосфата. Существует ряд белков (гликогенсинтаза, Src, c-Jun, c-fos, p56, NF-AT и др.) - которые переходят в активное состояние после дефосфорилирования. Участие щелочной фосфатазы в дефосфорилировании гистонов и гликогенсинтазы [Huang K. et al., 1980] указывает на место фермента в регуляции синтеза гликогена и экспрессии генома в клетках млекопитающих. Нарушение регуляции распада или синтеза гликогена путем внесения изменений в аллостерическую регуляцию или ковалентную модификацию гликогенфосфорилазы приводит к нарушению гомеостаза глюкозы в крови [Newgard C. et al., 1989; Johnson N., 1992]. Соотношение между синтезом и распадом гликогена регулируется нейрогуморальным путём и осуществляется в основном киназами и фосфатазами. Активация гликогенфосфорилазы (ГФ) путем фосфорилирования обеспечивает быструю мобилизацию глюкозы для снабжения жизненно важных органов «высокоэнергетическим» топливом [Newgard C. et al., 1989; Madsen N., 1986; Sprang S. et al., 1988]. Обнаруженные существенные изменения в уровнях активности фосфомоноэстераз в опухолевых и трансформированных клетках, а также ГФ при некоторых патологических процессах, говорят о значимости этих ферментов в регуляции различных механизмов обмена веществ. Это позволяет использовать в клинике качественные и количественные отклонения данной группы ферментов в

качестве информативных маркеров при многих заболеваниях [Hammond K. et al., 1990; Davie M. et al., 1991].

В последние годы определённый интерес представляет изучение молекулярных механизмов и определение места в многоуровневой системе иерархии гипоталамических нейрогормонов пептидной природы. Регуляторные пептиды и сопряженные с их функцией ферменты следует рассматривать как сложную адаптивную систему организма, организующую реализацию приспособительных реакций на всех уровнях его интеграции. К подобной группе жизненно важных пептидов с невыясненным до конца молекулярным механизмом действия, относятся и гипоталамические пролином богатые пептиды (ПБП), выделенные Галояном и сотр. из нейросекреторных ядер гипоталауса (N. Paraventricularis и N. Supraopticus) крупного рогатого скота. Впоследствии была выяснена первичная структура этих пептидов, что позволило синтезировать их. Из выделенных пептидов, наиболее изучен ПБП-1, названный Галармином, состоящий из 15 аминокислот со следующей первичной структурой: Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr [Galoyan A., 1997, 2000, 2004; Markosian K. et al., 1998]. К настоящему времени открыт широкий спектр биологической активности ПБП-1: Галармин обладает иммуномодулирующим, антиоксидантным, нейропротекторным, противопухолевым, гемопозитическим свойствами, является регулятором гуморального и клеточного иммунитета, лимфомиелопоза [Aprikyan V., 1999; Galoyan A., 2002, 2004, 2008; Davtyan T. et al., 2005; Abrahamyan S. et al., 2004, 2007, 2011]. Воздействие ПБП-1 на иммунную и нервную системы сопровождается заметной стимуляцией белкового, липидного и углеводного обмена. В последнем важное место занимает цАМФ-зависимая система ферментов, запускаемая аденилатциклазой, посредством активации которой гормоны (возможно, также и ПБП-1), регулируют клеточный обмен. Между тем, выяснение роли и механизмов участия ПБП-1 в регуляции деятельности ферментов данного каскада, в том числе ГФ, позволило бы по новому взглянуть на некоторые стороны обмена гликогена в тканях-мишенях и использовать ПБП-1 в клинической энзимологии. Нарушение функционирования клеток в значительной степени определяется изменениями внутриклеточной системы регуляции различных клеточных процессов – системы вторичных посредников. В настоящей работе была поставлена также задача – определить биохимические механизмы взаимосвязи между сигнальными молекулами головного мозга (в частности ПБП-1) и системой вторичных посредников (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}) в кардиомиоцитах желудочков сердца. Комплексное изучение путей регуляции ферментов углеводно-фосфорного обмена позволит с принципиально новых позиций оценить роль гипоталамического нейропептида ПБП-1, как регулятора фосфомоноэстераз и гликогенфосфорилазы, даст возможность направленно влиять на ряд метаболических процессов, способствуя восстановлению нормального статуса организма, откроет новые перспективы для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями данной системы.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования состояла в сравнительном изучении влияния гипоталамического нейропептида ПБП-1 на активность фосфомоноэстераз (КФ и ЩФ) и ГФ в тканях здоровых крыс и при паталогиях. Для достижения указанной цели проводили исследования по следующим направлениям:

1. Определение оптимальных доз ПРП-1 в активации фосфомоноэстераз и ГФ в условиях *in vivo*.
2. Исследование действия ПБП-1 на ферментативную активность фосфомоноэстераз и ГФ у крыс при фармакологической десимпатизации введением 6-гидроксидофамина (6-ОНДА).
3. Изучение влияния ПБП-1 на активность фосфатаз и ГФ костного мозга на модели гемо- и иммунодепрессии, индуцированной введением циклофосамида (ЦФ).
4. Выяснение возможного участия и роли ПБП-1 в каскадной системе регуляции ГФ при наличии в системе ингибитора аденилатциклазы, 2',5'-дидеоксиаденозина (ДДА).
5. Изучение зависимости ферментов углеводно-фосфорного обмена центральных органов кроветворной системы (костный мозг, печень, селезенка) от функционального состояния паравентрикулярных ядер гипоталамуса, с целью подтвердить гипотезу А. Галояна о существовании оси гипоталамус-костныймозг.
6. Оценка влияния нейропептида на системы вторичных посредников (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}) в первичной культуре клеток миокарда и гипофиза, а также в эмбриональных клетках почки человека НЕК293.

Научная новизна. Изучение путей регуляции ферментов углеводно-фосфорного обмена у крыс позволило с принципиально новых позиций произвести оценку роли гипоталамического нейропептида ПБП-1, как регулятора фосфомоноэстераз и ГФ – основного фермента распада гликогена. Результаты, полученные при *invivo* изучении влияния ПБП-1 на активность исследуемых ферментов здоровых крыс, выявили увеличение активности ГФ, что указывает на усиление метаболических процессов под влиянием пептида. Анализ данных действия ПБП-1 на фосфомоноэстеразы и ГФ у крыс с моделью нейтропении и при фармакологической десимпатизации позволил нам сделать заключение о непосредственном коррегирующем влиянии ПБП-1 на углеводно-фосфорный обмен. Экспериментальные данные позволяют заключить, что исследуемый пептид контролирует направленность ГФ в тканях мишенях, минуя аденилатциклазную систему передачи сигнала. Подобный факт свидетельствует о гибкой координации ГФ нейропептидом и дает основание включить его в ряд гормонов, контролирующих направленность известного каскада. Использование метода, основанного на индуктивно-резонансном переносе энергии (FRET) между двумя флуоресцирующими белками, позволило впервые вопыгах *invivo* выявить характерные закономерности изменения скорости образования внутриклеточных вторичных

посредников (цАМФ, цГМФ) в различных органах мышей в ответ на введение нейропептида ПБП-1. Впервые исследовано влияние ПБП-1 на кальциевый обмен в культивированных кардиомиоцитах и клетках гипофиза мышей.

Научно-практическая ценность работы. Исследование свойств ключевых ферментов, определяющих ход метаболических процессов, является одним из необходимых условий в определении понятия о “стандартах организма”, касающихся функциональных, биофизических и биохимических показателей организма. Обнаруженный нами в данной работе регулирующий эффект гипоталамического пептида ПБП-1 в отношении ферментов КФ, ЩФ, а также ПФ подтверждает способность данного пептида поддерживать динамическое равновесие уровня внутриклеточной фосфорилированности у млекопитающих. Одним из возможных метаболических путей влияния ПБП-1 на углеводный обмен является ингибирование или активирование ряда протеинкиназ и протеинфосфатаз, ведущих к фосфорилированию или дефосфорилированию соответствующих белков-мишеней. Изучение патогенеза и фармакологической коррекции гемо- и иммунодепрессии, индуцированной введением циклофосамида, остается одной из актуальных задач современной медицины. Научная ценность результатов наших исследований заключается в выявлении способности ПБП-1 ускорять процессы тканевой регенерации и препятствовать развитию нейродегенеративных процессов у животных.

Учитывая, что при ряде патологических состояний активности ферментов углеводно-фосфорного обмена отклоняются от нормы, есть основания полагать, что модулируя активности фосфомоноэстераз и ГФ с помощью нейропептида ПБП-1 и его аналогов, можно будет направленно изменять определенные метаболические процессы, тем самым способствуя восстановлению нормального статуса организма. Расшифровка молекулярных механизмов действия нейропептида ПБП-1 представляет важнейший этап в понимании закономерностей регуляторного влияния пептидов на функциональную активность универсальных цАМФ-зависимых систем клетки. Экспериментально нами показана степень вовлеченности внутриклеточных систем Ca^{2+} , цАМФ и цГМФ в передаче сигнала, индуцированного нейропептидом ПБП-1. Таким образом, практическая значимость результатов наших исследований в том, что они открывают пути для практического применения ПБП-1 в медицине и для разработки нового класса препаратов, мишенью которых является система вторичных посредников.

Апробация работы. Содержание диссертации докладывалось на международных научно-практических конференциях по теме: “Перспективы развития гематологии и трансфизиологии” (Армения, Ереван, 9-10 окт., 2008г.), “Иммунная система мозга: нейрохимические и нейроэндокринные аспекты” (Армения, Ереван 6-8 окт., 2009), “Новые аспекты молекулярной биотехнологии и биохимии” (Армения, Ереван, 27-28 июня, 2013), 11-й форум молодых ученых федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Италия, Турино, 23-25 июня, 2011); 36-ой конгресс FEBS (Италия,

Торино, 23 июня - 1 июля, 2011), на научных семинарах в Институте биохимии им. Г.Х. Буниатяна НАН РА. Работа была апробирована на заседании Ученого совета Института Биохимии НАН РА (2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей, 3 тезиса.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, использованных методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа представлена на 103 страницах машинописного текста, содержит 34 рисунка. Библиографический указатель включает 167 наименований литературных источников на русском и английском языках.

Место выполнения работы. Работа выполнена в отделе биохимии нейрогормонов Института биохимии им. Г.Х. Буниатяна НАН РА, в лаборатории физиологии компенсации функций ЦНС Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА, и в отделе кардиологии и пульмонологии Георг-Август-Университета, Геттинген, Германия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

В опытах были использованы беспородные крысы-самцы массой 150-220 г., содержащиеся на общем пищевом режиме.

Модель нейтропении. Экспериментальную гемо- и иммуносупрессию у крыс вызывали внутрибрюшинным (в/б) введением циклофосамида (ЦФ) [Zusman I., et al., 2002; Psenak O., et al., 2003]. 25-и крысам массой 125 г. вводили по 10 мг ЦФ в 0,5 мл физраствора на животное. Через час экспериментальным животным (n = 12) в/б вводили ПБП-1 из расчета 15мкг на 100г. ж/в в 0,5 мл физрастворе, а контрольной группе (n = 13) вводили идентичный объем физраствора. В 1-й, 4-й, 7-й и 11-й дни под наркозом декапитировали по 3 крысы из каждой группы. На холоду извлекали селезенку и костный мозг и проводили гомогенизацию в физрастворе (вес/объем – 1/10-селезенка, 1/40- костный мозг).

Модель десимпатизации. Периферическую десимпатизацию у экспериментальных крыс (n = 4) вызывали путем в/б инъекции 6-гидроксидофамина (6-ОНДА) в 1%-ном растворе аскорбиновой кислоты в физрастворе, в дозе 40 мг на кг животного [Gee P., et al., 1989; Kostrzewa R. M., et al., 1974; Cohen G., Heikkila R. E., 1974]. Через день инъекцию повторяли. Для выяснения роли нейропептида при данной патологии, аналогичной группе животных (n = 4) за день до десимпатизации был введен в/б ПБП-1 из расчета 10 мкг на 100г ж/в. Все три группы крыс (включая равнозначную контрольную группу, которой в указанном режиме и количестве вводили растворители) были декапитированы на 5-ые сутки. На холоду извлекали селезенку и костный мозг и гомогенизировали в физрастворе, как описано выше.

Стимуляция паравентрикулярных ядер на модели крыс, подвергшихся периферической десимпатизации введением 6-ОНДА. Десимпатизированным крысам в паравентрикулярные ядра оперативным путем вводили электроды, генерирующие электрические импульсы частотой 100 Гц, длительностью 1 сек, три раза, с интервалом 5 сек. Послетаккой стимуляции крысы были декапитированы и извлеченные ткани обрабатывали, как указано выше.

Определение активностей ферментов. Для определения ферментативных активностей использовали спектрофотометрические методы.

Активность щелочной (ЩФ, К.Ф. 3.1.3.1) и кислой фосфатаз (КФ, К.Ф. 3.1.3.2) в гомогенатах определяли методом Шлыгина и Михлина [Шлыгин Г., Михлин С., 1955]. В качестве субстрата использовали п-нитрофенилфосфат (“Serva”) в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М в медианальном буфере, рН 9,6 для щелочной фосфатазы, и рН 4,6 – для кислой. Реакцию останавливали добавлением 2 мл охлажденной 40%-ной ТХУ. Активности ферментов оценивали по количеству паранитрофенола выделенного в течении 1 часа при 37°C (увеличение поглощения при длине волны 410 нм) используя в качестве стандарта раствор паранитрофенола.

Активность неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) определяли методом Геппеля [Hepfel L., 1955]. В качестве субстрата использовали неорганический пирофосфат натрия в медианальном буфере, рН 7,2. Реакцию останавливали добавлением охлажденной 40%-ной ТХУ. Активность фермента определяли по количеству неорганического фосфора, выделенного в течении 1 часа при 37°C по методу Таусски и Шора [Taussschy H., Short F., 1953]. Для окраски фосфора использовали фосфореагент, состоящий из 10% аммоний молибдата, приготовленного на 10N H₂SO₄, с добавлением сульфата железа (II), поле чего раствор колориметрировали при 630 нм.

Активность гликогенфосфорилазы (ГФ, К.Ф. 2.4.6.1) определяли по Иллингворт и Кори [Illingworth B., Cori G., 1953]. Инкубационная смесь, содержащая 0,1 мл гомогената исследуемой ткани, 0,1 мл 4%-ного водного раствора гликогена, 0,1 мл ТЭМ буфера (рН 6,8; 0,04 М ТРИС, 0,002М ЭДТА и 0,01М меркаптоэтанол), 0,1 мл ПБП-1(разных концентраций), (всего 0,4 мл), прединкубировали в течении двух минут при 32°C. Ферментативную реакцию начинали добавлением 0,1 мл глюкозо-1-фосфата (64 мМ). После инкубирования реакционной смеси в течении 5 мин, реакцию останавливали добавлением 1,6 мл охлажденной 5%-ной ТХУ. Количество отщепившегося фосфора определяли по методу Таусски и Шора [Taussschy H., Short F., 1953]. За единицу активности каждого фермента (Е) принимали то его количество, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата в минуту с 1г ткани.

Определение уровней внутриклеточных мессенджеров в реальном времени.

Для измерения внутриклеточных уровней цАМФ и цГМФ в реальном времени использовали метод резонансного переноса энергии флуоресценции (Fluorescent resonance energy transfer, FRET).

Культура клеток, экспрессирующих индикаторы: Клетки, экспрессирующие FRET-биосенсоры Eраc1-camps (для измерения цАМФ) [Nikolaev V., Bünemann M., 2004] или red GES-DE5(для измерения цГМФ) [Nikolaev V., Gambaryan S., 2006] были получены путем культивации и трансфекции НЕК-293А клеток. Были выделены и исследованы также первичные кардиомиоциты желудочков сердца [Calebiro D. et al., 2009] и клеток гипофиза мышей, [Lepore D. et al., 2005] экспрессирующих генетически-кодируемые FRET-биосенсоры. При изучении лиганд-индуцированных изменений FRET, клетки находились в FRET-буфере (144 ммольNaCl, 5 ммольKCl, 2 ммольCaCl₂, 1 ммольMgCl₂, 20 ммоль N-2-Гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоная кислота (HEPES), pH = 7,3), содержащем исследуемый лиганд. В экспериментах был использован ZeissAxiovert 200 инвертированный микроскоп, оснащенный объективом масляной иммерсии x100, со двоянной фотометрической системой и источником света Полихром IV (TillPhotonics, Grafelfing, Германия).

Измерения цАМФ в реальном времени. FRET-индикатор на основе Eраc1-camps состоит из цАМФ-связывающего домена (Eраc1) (exchange protein directly activated by cAMP), с которым связаны желтый флуоресцентный (Yellow Fluorescent Protein, YFP) и циановый флуоресцентный (Cian Fluorescent Protein, CFP) белки. Под действием монохроматического света в области 436 ± 10 нм (светоделитель DCLP, 460 нм), регистрировали флуоресценцию науровне одной клетки по каналам YFP(535 ± 15) и CFP(485 ± 20 нм). Перенос флуоресцентной энергии, FRET, оценивали как отношение эмиссии акцептора, YFP, к флуоресценции донора, CFP (535/485). Снижение отношения эмиссий 535/485 свидетельствует об увеличении концентрации цАМФ.

Измерения цГМФ в реальном времени. В наших экспериментах был использован сенсор redcGES-DE5, в конструкции которого цГМФ-связывающий домен фосфодиэстеразы (PDE5) был внедрен между флуоресцентными белками, названными “Sapphire” и “димер 2”. Для FRET измерений клетки подвергали воздействию монохроматического света в области 450 нм. Изменение отношения флуоресценции акцептора, RedFP, при 590 нм к флуоресценции донора, Sapphire, при 515 нм, измерено в клетках, стимулированных различными концентрациями ПБП-1 и натриуретическим пептидом С-типа (CNP). При наличии цГМФ в клетках, экспрессирующих сенсор redcGES-DE5, резонансный перенос энергии флуоресценции от донора к акцептору ослабляется и наблюдается снижение уровня FRET, т.е. отношение эмиссии акцептора к эмиссии донора, 590/515.

Изменение внутриклеточного кальция. Для количественного определения концентрации свободного цитозольного кальция использовали флуоресцентный Ca²⁺-чувствительный краситель Фура-2 АМ [Xu Y., 1997]. В экспериментах Фура-2 АМ возбуждается при длинах волн 340 и 380 нм (максимумы поглощения Ca²⁺-связанных и Ca²⁺-свободных форм Фура-2 АМ). При этом, как правило, флуоресцентное излучение регистрируется при одной и той же длине волны. 520 нм, с использованием фотоумножителя, от которого сигнал поступает на компьютер с соответствующим программным обеспечением. При образовании комплекса с ионами Ca²⁺ наблюдается смещение

спектра возбуждения Fura-2 от 380 нм к 340 нм без изменения спектра эмиссии. Из отношения интенсивностей флуоресценции, возбуждаемой на двух различных длинах волн, получается пара данных, из которых рассчитывается соотношение связанного и свободного Ca^{2+} : концентрация свободного внутриклеточного Ca^{2+} пропорциональна отношению флуоресценции при 340/380. Флуоресценцию Фура-2АМ регистрировали как описано выше.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента. Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1 Влияние различных концентраций нейропептида ПБП-1 на активности ферментов углеводно-фосфорного обмена

В медицине используются гормоны, обладающие широким спектром терапевтического действия ввиду их способности влиять на активность ферментативных систем и клеточный метаболизм. Гипоталамический нейропептид ПБП-1, исследуемый сотрудниками института на протяжении многих лет, проявляет широкий спектр биологических активностей, таких как иммуномодулирующий, противоопухолевый, нейропротекторный, антиоксидантный, антибактериальный и гемопозитические свойства [Galoyan A. A., 2008].

В сфере вышесказанного, пептид представляет определенный интерес в вопросах регуляции углеводно-фосфорного обмена как в здоровом организме, и особенно при патологии. В проводимом нами исследовании было испытано *in vivo* действие трех доз нейропептида (30; 3 и 0,3 мкг на животное) на активность фосфомоноэстераз и ГФ у здоровых крыс. Полученные результаты (Рис.1) позволили судить о неоднозначном влиянии биостимулятора на каталитическую активность изученных ферментов: после инъекции животным наибольшей дозы ПБП-1 (30 мкг), ЩФ в обоих тканях проявила резистентность к пептиду, КФ в костном мозге селезенке была ингибирована на 60 и 40 %, соответственно. Наблюдалась некоторая активация ГФ в селезенке при индифферентности фермента костного мозга. Интересно, что введение 3 мкг пептида приводило к существенному активированию ГФ в костном мозге, а введение наименьшей дозы (0,3 мкг), активировало ГФ в обоих исследованных тканях. Таким образом, пептид, введенный *in vivo* животным в малых дозах, усиливает процессы фосфорилирования (активация ГФ) и понижает процессы дефосфорилирования (ингибирование КФ).

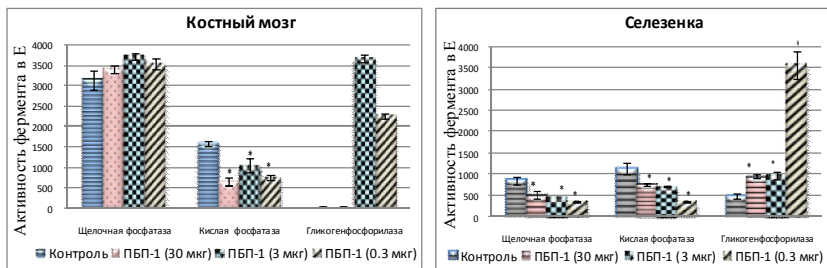


Рис. 1. Влияние трех доз ПБП-1 на активность гликогенфосфорилазы, щелочной и кислой фосфатаз костного мозга (* - достоверность по сравнению с контролем, $P < 0,001$) и селезенки (* – достоверность $P < 0,05$) здоровых крыс.

1.2 Исследование действия ПБП-1 на активность фосфоэстеразы ГФ в костном мозге и селезенке крыс при десимпатизации

Одним из механизмов согласованности общих метаболических потребностей организма с потребностями клетки являются нервные и гормональные связи с ключевыми ферментами. Для нас представляло интерес выяснить возможное влияние экзогенного ПБП-1 на активности ферментов углеводно-фосфорного обмена у крыс с нарушением нейрогуморальных функций, вызванным введением 6-ОНДА. Взаимодействие между цитокинами и симпатической нервной системой было продемонстрировано в работах Катаямы соавт. [Katayama Y., et al., 2006]. Они показали, что адренергический сигнальный путь контролирует количество высвобождаемых кроветворных клеток-предшественников (гемопоэтические прогениторные клетки - ГПК), вызванных гранулоцитарным колоно-стимулирующим фактором (G-CSF). Интерес представляет и то, что животные, подвергшиеся временному разрушению катехоламинергических нейронов под воздействием 6-ОНДА, не в состоянии мобилизовать эти клетки из кроветворных ниш. По данным ряда авторов [Wetzel B. et al., 1967; Uyeki E., 1963; Sejic S., 1970], повышение активности КФ костного мозга при различных патологиях связано с накоплением большого количества тромбоцитов и эритроцитов – кроветворных клеток, содержащих высокий уровень КФ.

В наших опытах периферическая десимпатизация крыс введением 6-ОНДА также привела к определенным сдвигам в активности фосфатаз: активность ЩФ костного мозга незначительно понизилась, а КФ возросла вдвое, (Рис. 2, А). В селезенке активности обоих фосфатаз были достоверно понижены (Рис. 2, Б). Для выяснения роли нейропептида при данной патологии, за день до десимпатизации животным был введен нейропептид ПБП-1 из расчета 15 мкг на 100 г. ж/в. Полученные результаты показали, что в присутствии пептида активность КФ костного мозга не изменилось по сравнению с десимпатизацией без пептида, оставаясь выше нормы (Рис. 2, А), на КФ в селезенке

наличие пептида на фоне десимпатизации не влияло. Влияние ПБП-1 на ЩФ в обоих тканях в данном опыте незначительно.

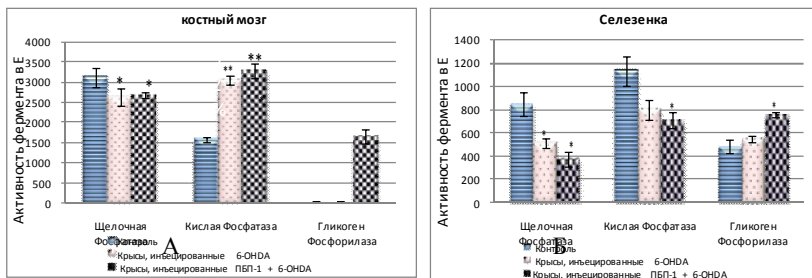


Рис. 2. Активность гликогенфосфорилазы, щелочной и кислой фосфатаз при периферической десимпатизации крыс введением 6-OHDA (4 мг на 100 г ж/в) без и под влиянием нейропептида ПБП-1 (15 мкг на 100 г ж/в) в костном мозге (* $P < 0.005$, ** $P < 0.001$) и в селезенке (* $P < 0,05$) крыс.

Как установлено Глинкой и соавт. [Glinka Y. et al., 1997; 1998], 6-OHDA подавляет процесс окислительного фосфорилирования, в результате чего уменьшается внутриклеточное содержание АТФ, что в конечном счете приводит к гибели клетки. Периферическая десимпатизация крыс введением 6-OHDA не влияла на распад гликогена: активность ГФ в гомогенатах обеих тканей, фактически, оставалась на уровне нормы (Рис. 2, А и Б). В присутствии ПБП-1 распад гликогена в селезенке был стимулирован на 55%. В костном мозге, на фоне нулевых величин у интактных и десимпатизированных животных, ГФ под действием нейропептида достигла 1650 Единиц активности (Рис. 2, А). Очевидно, что образовавшийся глюкозо-1-фосфат непосредственно вовлекается в гликолиз, восстанавливая запасы АТФ.

1.3 Влияние ПБП-1 на активность фосфоэстераз и гликогенфосфорилазы костного мозга крыс при гемо- и иммунодепрессии, вызванной циклофосамидом (ЦФ)

Клеточный обмен крови и кроветворных органов представляет собой систему, находящуюся в здоровом организме в динамическом равновесии. При ряде заболеваний это равновесие нарушается, изменяется специализация отделов кроветворной системы. Циклофосамид (ЦФ) является цитостатиком-иммунодепрессантом. Он подавляет функцию костного мозга. В данной серии экспериментов мы попытались выявить изменения в обмене гликогена и фосфора на модели гемо- и иммуносупрессии в костном мозге крыс, индуцированных однократным введением ЦФ [Psenak O. et al., 2003; Zusman I. et al., 2002] и выяснить роль нейропептида в деятельности исследуемых ферментов при данной патологии. Щелочная фосфатаза является одним из известных маркеров клеточной пролиферации [Pfander D., 2001]. Она играет важную роль в поддержании проницаемости клеточных мембран. Ранее наблюдалось понижение

активности фермента на модели иммуносупрессии у мышей, индуцированных циклофосфамидом [Pratheeshkumar P., 2010].

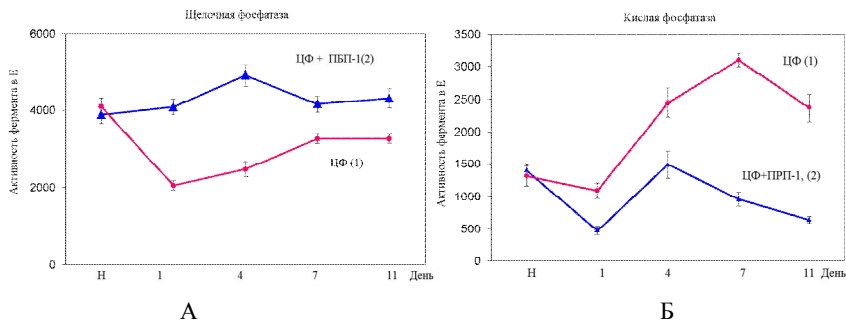


Рис. 3. Влияние ЦФ и ПБП-1(*in vivo*) на активность щелочной и кислой фосфатаз костного мозга крыс; 1 –ЦФ вводили крысам (из расчета 8мг / 100г ж/в), 2–ПБП-1 (из расчета 10мкг / 100г ж/в), через 1 час после ЦФ.

Это согласуется с результатами наших экспериментов: понижение активности ЩФ на 50% (Рис.3, А, кривая 1) было зафиксировано в первый день после введения ЦФ, с последующим приближением к норме. Возможно, причиной понижения ферментативной активности ЩФ является повреждение мембран под воздействием ЦФ. С другой стороны, подобное понижение может быть результатом уменьшения числа клеток костного мозга [Kola I., Folb P., 1985]. Кривая 2 на Рис.3, А показывает, что спад уровня ЩФ в костном мозге, связанный с патофизиологией организма после введения крысам ЦФ, в присутствии ПБП-1 на 4-ый день увеличивается на 97%, но в целом остается в пределах нормы на протяжении 11 дней. Подобный феномен, несомненно, указывает на протекторные свойства нейропептида по отношению к ЩФ. Подобно ЩФ, КФ также является фенотипическим маркером при ряде заболеваний [Tarle M., 1989; Hammond K., 1990; Little C., 1978]. Этот фермент в большом количестве обнаружен в тканях предстательной железы, он обнаружен также в печени, селезенке, костном мозге, эритроцитах [Eze L., 1974] и тромбоцитах. Динамика активности КФ, согласно кривой (1) на Рис.2 Б, под действием ЦФ повышается, и наивысший его пик приходится на 7-ые сутки после инъекции (+140 %).

Согласно работе Нон [Нон Н. et al., 2012], ЦФА понижает количество эритроцитов в крови животных. Повышение активности КФ в наших работах, возможно, является результатом выхода данного фермента из эритроцитов в процессе гемолиза. Введение крысам ПБП-1 на фоне ЦФ значительно нормализует картину: снимается активирующий эффект ЦФ, активность КФ приближая к контрольной. Подобный феномен мы вправе объяснить тем, что ПБП-1 в какой-то мере препятствует разрушению эритроцитов и тромбоцитов и тем самым уменьшает выход КФ из этих клеток. Неорганический пирофосфат является общим метаболитом практически всех

ключевых путей метаболизма [Heinonen J., 2001]. Синтез многих важнейших компонентов клетки (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды), а также активация жирных кислот и расщепление АТР, протекают с образованием пирофосфата (РР).

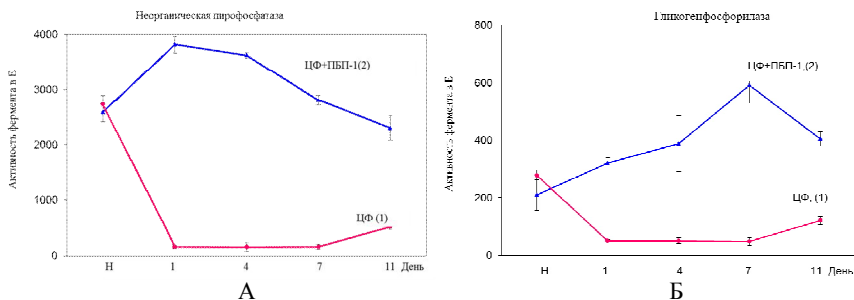


Рис. 4. Влияние ЦФ и ПБП-1 (*in vivo*) на активность неорганической пирофосфатазы и ГФ костного мозга крыс: 1 – ЦФ – вводили крысам (из расчета 8мг / 100г ж/в), 2–ПБП-1 (из расчета 10мкг / 100г ж/в),через 1 час после ЦФ.

В то же время, эффективность процесса синтеза обеспечивается смещением термодинамического равновесия за счет расщепления РР. Это достигается быстрым гидролизом РР неорганическими пирофосфатазами (ПФ), которые тем самым регулируют концентрацию неорганического РР. В наших экспериментах ЦФв 1-ый же день доводит активность ПФ до нуля и ингибирует фермент на протяжении 10 дней наблюдения (Рис. 4 А, кривая 1). В присутствии нейропептидакартина совершенно другая (Рис. 4 А, кривая 2). Уже через день после введения ПБП-1, активность фермента возрастает до 150 % по сравнению с нормой, с последующим понижением к показателям здоровых крыс на 11-й день.

В клинической практике гликоген в бластных клетках определяется при дифференциальной диагностике различных форм острого лейкоза, когда количество гликогена значительно сокращается. ЦФ ведет к уменьшению общего числа клеток в костном мозге, задержке созревания и снижению содержания гранулоцитов, затем лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. Гликогенфосфорилазная активность была обнаружена в нейтрофилах, эозинофилах и миелоцитах костного мозга [Takeuchi T. At al., 1956]. По имеющимся в литературе данным, после применения ПБП-1 число моноцитов и гранулоцитов (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) костного мозга и периферической крови крыс возрастает [Galoyan A., 2008]. В наших экспериментах кривая 1 на Рис. 4 Б, свидетельствует о том, что развивающаяся гранулоцитопения в 1-ый же день приводит к значительному спаду активности ГФ. У животных, которым наряду с ЦФ введен ПБП-1, не только снимается ингибирующий эффект ЦФ, но

интенсивно повышается активность ГФ до 180 % на 7-ые сутки. Затем наблюдается тенденция к нормализации активности фермента (Рис. 4 Б, кривая 2).

1.4 Участие паравентрикулярных ядер в регуляции активности углеводно-фосфорного обмена в селезенке и костном мозге белых крыс

Экспериментальные данные о влиянии нейропептидов (ПВП-1 и его производных) на самые различные функции организма гипоталамических, и, в частности, на функции костного мозга (через пролиферацию и дифференцировку клеток костного мозга) [Galoyan A., Arpikeyan V., 2002], послужили основанием для изучения зависимости метаболизма углеводно-фосфорного обмена организма от функционального состояния паравентрикулярных ядер (ПВЯ) гипоталамуса. Проведенное в настоящей работе исследование сдвигов в активностях кислой и щелочной фосфатаз и гликогенфосфорилазы с использованием метода стимуляции паравентрикулярных ядер у интактных и заранее подвергнутых фармакологической десимпатизации крыс, выявляет связь между гипоталамусом и костным мозгом. Стимуляция ядер гипоталамуса, независимо от того к какой топографической группе они относятся, непременно сопровождается сложными гормональными реакциями; увеличивается выделение тропных гормонов передней доли гипофиза, секреция задней доли. Из литературы известно, что стимуляция паравентрикулярных ядер проявляется катаболическим эффектом.

Нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса наряду с пептидными нейрогормонами вырабатывают также кортикотропин-рилизинг-гормон (КРГ), который стимулирует секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ) в гипофизе (центральной эндокринной железе) и тем самым активирует гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему. Увеличение содержания КРГ в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при раздражении ПВЯ (или под влиянием стресса) приводит к активации симпатической системы и выбросу норадреналина и адреналина в общий кровоток. Адреналин, стимулируя активацию ГФ, вызывает распад гликогена, тем самым повышая концентрацию глюкозы в крови и тканях животных.

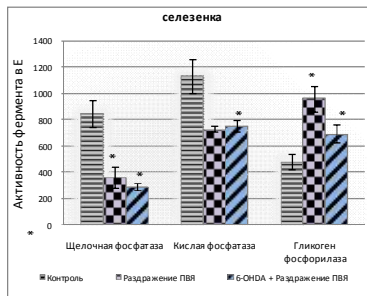
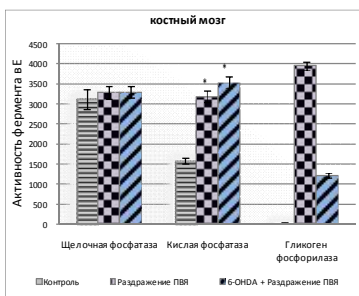


Рис. 5. Активность гликогенфосфорилазы, щелочной и кислой фосфатаз костного мозга (достоверность по сравнению с контролем, * – $P < 0.001$) и селезенки (* – $P < 0.05$) крыс. Наблюдаемое в наших экспериментах повышение активности гликогенфосфорилазы в костном мозге при стимуляции ядер гипоталамуса согласуется с ожидаемым из литературных данных. В некоторых опытах действие симпатической нервной системы было временно блокировано введением 6-OHDA, тем самым из действующей системы были исключены адреналин и норадреналин. Как видно из Рис.5, несмотря на угнетение периферической симпатической системы, стимуляция ПВЯ индуцировала катаболические процессы в этих тканях, что выражалось в активации ГФ. При всех случаях наши эксперименты свидетельствуют, что нейропептиды и цитокины (возможно и ПБП-1), выбрасываемые из гипоталамуса при электрической стимуляции, прямо или опосредованно регулируют ферменты углеводно-фосфорного обмена в гемопозитических тканях и подтверждает гипотезу акад. А.Галояна о существовании оси гипоталамус-костный мозг.

1.5 Поиск нейрогуморальных путей регуляции активности гликогенфосфорилазы тканей крыс нейропептидом ПБП-1.

Выявление места и механизм пострецепторного действия нейросекреторного цитокина мозга (ПБП-1) в каскаде регуляции гликогенфосфорилазы – наиболее важного фермента деградации гликогена – представляет особый интерес, поскольку даст возможность найти альтернативный путь регуляции фермента. Известно, что гормональная регуляция ГФ осуществляется не прямо, а через каскадные реакции уселения сигнала, включающие соответствующие протеинкиназы и фосфатазы. Внеклеточные мессенджеры передают сигнал в ткани мишени посредством каскадных механизмов, включающих серию внутриклеточных сигналов – вторичных, третичных и т.д., мессенджеров. Аденилатциклаза является генератором вторичного внутриклеточного посредника цАМФ. Образовавшийся цАМФ способен, активируя цАМФ–зависимую протеинкиназу, передать гормональный сигнал к различным эффекторным системам, вплоть до ГФ. В данной серии экспериментов была предпринята попытка выявить связь между ПБП-1 и аденилатциклазным путем передачи гормонального сигнала. 2',5'-дидеоксиаденозин (ДДА) относится к классическим мембранно-проницаемым ингибиторам аденилатциклазы [HaertleT., 1998]. Механизм его действия основан на блокировании АТФ-связывающего участка циклазы. Введение крысам только ПБП-1 приводило к значительной активации ГФ в обеих тканях (Рис. 6, данные 1). Изданных Рис. 6, 2, видно, что через 24 часа после введения только ДДА, фосфорилазная активность в гомогенатах печени и селезенки подверглась ингибированию на 40 и 15%, соответственно.

На следующем этапе работы мы попытались выявить возможное участие ПБП-1 в передаче гормонального сигнала при блокировании аденилатциклазы. С этой целью однократно, с интервалом в 30 мин, крысам последовательно вводили ПБП-1 и ДДА.

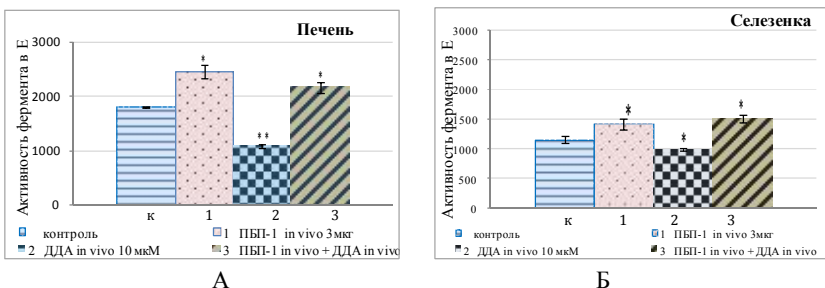


Рис. 6. Активность гликогенфосфорилазы печени (А - * $p < 0.001$, ** $p < 0.005$) и селезенки (В - * $p < 0.01$) крыс, через 24 часа после введения животным ПБП-1 и ДДА в отдельности (соответственно, 1 и 2) и совместно (3).

Полученный нами результаты (Рис. 6, данные 3), свидетельствуют о том, что пептид способствовал восстановлению активности ГФ. Эффективность Галармина на фоне ингибитора не только сохраняется но и несколько повышается как в печени так и в селезенке (рис. 6). Следовательно, ПБП-1 в какой-то степени участвует сложной системе гормональной регуляции деградации гликогена. Гипотеза исследования заключается в том, что нейропептид предположительно оказывает свое глюкозрегулирующее действие без участия аденилатциклазы. ПБП-1 создает условия для нормализации процессов фосфорилирования, так необходимых для метаболизма гликогена. Тем не менее, биологические механизмы, которыми осуществляется участие ПБП-1 в регуляции углеводного обмена, пока недостаточно ясны. В дальнейшем предполагается изучить поэтапно ферменты известного каскада, запускаемые цАМФ и их связь с нейропептидом.

1.5 FRET микроскопия для мониторинга сигнальных событий, индуцированных ПБП-1, в реальном времени.

Несмотря на имеющуюся информацию о множественных биологических функциях ПБП-1, пока мало известно о пространственно-временной динамике передачи сигнала, выванного им в живых клетках. С этой точки зрения актуальной является задача определения биохимических механизмов взаимосвязи между сигнальными пептидами головного мозга (в частности ПБП-1) и системой вторичных посредников (цАМФ, цГМФ и Ca^{2+}). Для решения поставленной задачи, мы изучали влияние ПБП-1 на уровень посредников в кардиомиоцитах (СМ) желудочков сердца мышей а также в клетках гипофиза и на клетках линии НЕК-293 (HumanEmbryonicKidney). Такой подход основан на том, что, цАМФ-, цГМФ- и Ca^{2+} -зависимые пути передачи сигнала являются общепринятой мишенью в комбинированном фармакологическом лечении сердечной недостаточности (ивабрадин, β -блокаторы, cGMP-elevatingdrugs).

Для количественного определения циклических нуклеотидов с помощью метода FRET, нами были использованы живые клетки, изолированные из трансгенных мышей, экспрессирующих сенсоры на цАМФ и цГМФ. Используя FRET-индикатор Eраc1-camps, разработанный специально для цАМФ [Nikolaev V. O., 2004], количественные изменения цАМФ можно отслеживать в реальном времени на уровне одной живой клетки. Eраc1-camps состоит из цАМФ-связывающего домена (Eраc1) (exchange protein directly activated by cAMP), с которым связаны желтый (YFP) и циановый (CFP) флуоресцентные белки. При низких концентрациях цАМФ, сенсор показывает высокую интенсивность FRET. И как только цАМФ занимает цАМФ-связывающий домен (CNBD), интенсивность FRET сильно понижается. Снижение соотношения флуоресценции акцептора к донору (YFP/CFP) для Eраc1-camps (ФЛ 535/485) свидетельствует об увеличении концентрации цАМФ.

По нашим результатам, добавление ПБП-1 (0.01, 0.1, 1 и 10 мкмоль) к клеточной культуре кардиомиоцитов не приводит к значительным изменениям концентрации цАМФ (Рис. 8). В то же время стимуляция кардиомиоцитов β -адренергическим агонистом – изопроterenолом, привело к снижению соотношения YFP/CFP, указывая на повышение уровня цАМФ. Ранее наши исследования свидетельствовали о влиянии ПБП-1 на фосфорилирование основных членов семейства MAPK [Galoian K. et al., 2012], и других регуляторов передачи сигналов. Интересно, что два цАМФ-эффектора: протеинкиназа А (PKA) и Eраc, могут косвенно активировать каскад MAPK. В наших исследованиях, по-видимому, Eраc-опосредованный путь передачи сигналов в кардиомиоцитах не играет существенной роли в трансдукции сигналов ПБП-1. Наши данные в некотором роде оставляют сомнения физиологической роли аденилатциклазной системы в качестве медиатора действия ПБП-1 в кардиомиоцитах. Участие фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов в передаче сигнала, индуцированного ПБП-1, подлежит дальнейшему изучению.

Как видно из рисунков, никаких существенных изменений в количестве цАМФ, после введения ПБП-1 в культуру HEK293 клеток, не наблюдалось. Мы использовали эту систему непосредственно на клетках, выделенных из гипофиза для изучения сигнала, посылаемого гипоталамусом предполагаемым рецепторам нейропептида ПБП-1.

Известно, что увеличение внутриклеточного уровня цАМФ специфическим подтипом аденилатциклазы в мембранах определенных клеток аденогипофиза приводит к увеличению выброса соответствующего гормона. В наших экспериментах ПБП-1 не дает накопления цАМФ в клетке и, следовательно, не участвует в синтезе гормонов гипофиза. Этот факт соответствует существующему мнению о том, что исследуемый нейрогормон выбрасывается в общий кровоток, минуя аденогипофизарную систему. Резюмируя проделанную работу, можно сказать, что с помощью флуоресцентных белков мы частично показали некоторые аспекты передачи сигнала нейропептида ПБП-1.

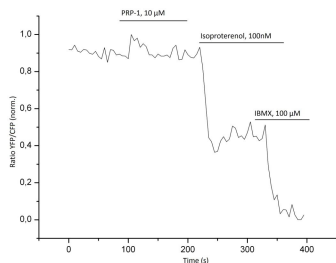


Рисунок 7. Кривая изменений внутриклеточной концентрации цАМФ в первичных кардиомиоцитах трансгенных мышей, экспрессирующих Eras1-camps сенсоры, индуцированных 10 мкмоль ПБП-1. Представлены данные 5 экспериментов.

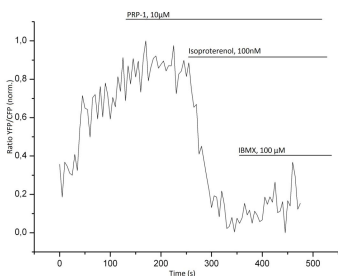


Рисунок 8. Кривая изменений внутриклеточной концентрации цАМФ в живых клетках НЕК293, индуцированных 10 мкмоль ПБП-1. Представлены данные 5 экспериментов

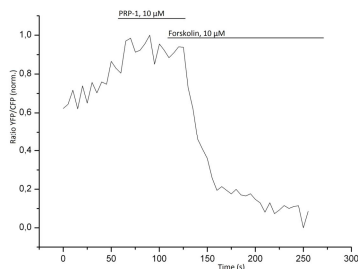


Рисунок 9. Кривая изменений внутриклеточной концентрации цАМФ в клетках гипофиза мышей индуцированных 10 мкмоль ПБП-1. FRET представлен как отношение флуоресценций акцептора и донора (535/485).

Действие ПБП-1 на гуанилатциклазу и на изменения внутриклеточной концентрации цГМФ кардиомиоцитов.

Препараты, поднимающие уровень цГМФ, успешно используются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (стенокардия, сердечная недостаточность и т.д) [Lincoln T., 2004]. В настоящее время признано, что многие эффекты NO/NP опосредованы, по крайней мере частично, через цГМФ-зависимые пути.

В наших экспериментах был использован один из наиболее чувствительных к цГМФ сенсоров, недавно сконструированный в Германии и любезно предоставленный нам, redcGES-DE5 [Niino Y., 2009]. При наличии цГМФ в клетках, экспрессирующих сенсоры redcGES-DE5, наблюдается снижение FRET, то есть резонансный перенос энергии флуоресценции от донора к акцептору ослабляется. Для FRET измерений, клетки подвергались воздействию монохроматического света при 450 нм с небольшим прямым возбуждением RFP акцептора. Регистрацию флуоресценции осуществляли на

уровне одной клетки по RFP и Sapphire каналам, с использованием фильтров эмиссии при 590 и 515 нм (максимумы эмиссии акцептора и донора). Изменение отношения эмиссий акцептора и донора (590/515) после «срабатывания» сенсора, была высчитана в клетках, стимулированных ПБП-1 при различных концентрациях, и натрийуретическим пептидом С-типа (CNP). Известно, что последний повышает уровень цГМФ через гуанилатциклазу. Результаты показали, что ПБП-1 при концентрации 0.1 мкмоль незначительно повышает уровень цГМФ в кардиомиоцитах.

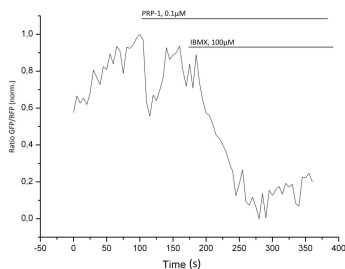
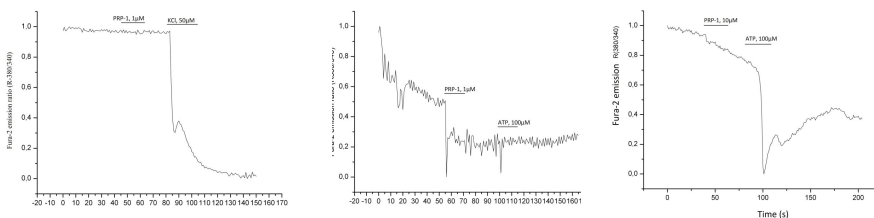


Рисунок 10. Мониторинг внутриклеточной концентрации цГМФ в кардиомиоцитах мышей экспрессирующих сенсор redcGEGS-DE5. Клетки были стимулированы вначале ПБП-1 (0.1 мкмоль), затем IBMX (100 мкмоль) и CNP (100 мкмоль). На рисунке представлено отношение флуоресценции акцептора к флуоресценции донора, RFP/Sapphire (590/515) до и после применения ПБП-1.

ПБП-1 индуцированное изменение внутриклеточного кальция.

Согласно существующим данным, амплитуда, частота, источник и внутриклеточная локализация сигналов от ионов Ca^{2+} являются идентификаторами определенных транскрипционных ответов клетки [Ikura M. et al., 2002]. Это позволяет управлять широким спектром клеточных процессов в ответ на Ca^{2+} .



- 1) 1 мкмоль ПБП-1
- 2) 1 мкмоль ПБП-1
- 3) 10 мкмоль ПБП-1

Рисунок 11. Динамика изменений внутриклеточного кальция в свежевыделенных кардиомиоцитах крыс (1) и мышей (2), а также в клетках гипоталамуса мышей (3) (в условиях *in vivo*) в ответ на действие ПБП-1.

Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} в первичных культурах клеток измерялась при помощи флуоресцентного зонда Fura 2-AM. Для количественного определения концентрации свободного цитозольного кальция мы использовали флуоресцентный Ca^{2+} -чувствительный краситель Фура-2 АМ (Molecular Probes, *In vitro*). При связывании ратиометрического зонда с кальцием наблюдается смещение максимума

возбуждения Fura-2 при 380 нм к 340 нм. При этом спектр эмиссии с максимумом в районе 510 нм, не меняется. Это дает возможность одновременно оценивать интенсивность флуоресценции кальций-связанной и кальций-свободной форм красителя при различных длинах волн возбуждения или регистрации. Таким образом, следует, что концентрация свободного внутриклеточного Ca^{2+} пропорциональна отношению флуоресценции при 340/380 [Xu Y. et al., 1997]. Динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, запускающих сокращения кардиомиоцитов, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии в культуре, менялась под воздействием пролином богатого полипептида. Апликация пептида в низкой концентрации (1 мкмоль) в культуре кардиомиоцитов вызывала мгновенное снижение амплитуды и через 5 секунд стабилизировалась на низком уровне (Рис. 11. 2). В то же время, уровень кальция в кардиомиоцитах крыс почти не менялся после применения ПБП-1 в тех же концентрациях (Рис. 11. 1). Высокая концентрация ПБП-1 (10 мкмоль) ведет к постепенному снижению амплитуды Са-сигналов в клетках гипофиза (Рис. 11. 3). Вопрос в том, что же определяет в каждом конкретном случае выбор пути трансдукции нейропептидного сигнала, в каких взаимоотношениях находятся эти пути и, наконец, каковы механизмы и факторы, регулирующие этот процесс селективности в клетке в настоящее время остается невыясненным.

ВЫВОДЫ

1. Активность ферментов углеводно-фосфорного обмена в кроветворных тканях (*in vivo*) под воздействием пролином богатого пептида -1 носит дозозависимый, разнонаправленный характер.
2. Пролином богатый пептид - 1 повышает активность гликогенфосфорилазы костного мозга и селезенки у десимпатизированным животных.
3. На модели нейтропении в костном мозге крыс пролином богатый пептид - 1 проявляет регулирующее воздействие на активность фосфомоноэстераз и гликогенфосфорилазы.
4. Установлено, что пролином богатый пептид - 1 осуществляет глюкозорегилирующее действие в печеночной ткани без участия аденилатциклазы.
5. Пролином богатый пептид-1 практически не влияет на концентрацию цАМФ и цГМФ в культивируемых кардиомиоцитах.
6. Пролином богатый пептид-1 вызывает увеличение концентрация Ca^{2+} в культивируемых кардиомиоцитах и в клетках гипофиза экспериментальных животных.
7. Электростимуляция паравентрикулярных ядер гипоталамуса крыс индуцирует катаболические реакции в костном мозге и в меньшей степени в селезенке, что выражается в активации гликогенфосфорилазы и кислой фосфатазы. Данный факт подтверждает гипотезу А. Галояна о существовании оси гипоталамус- костный мозг.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи:

1. L. P. Ter-Tatevosyan, L. V. Sarkisyan, L. A. Yerosyan, L. N. Arakelyan, E. A. Shirinyan, and A. A. Galoyan. Enzymes of Carbohydrate-Phosphorus Metabolism in the Bone Marrow and Spleen after Sympathectomy. Effects of Neuropeptide PRP-1. // *Neurochemical Journal*, 2009, V. 3(4), P. 301–304.
2. Г.М. Симонян, М.А. Бабаян, Л.Н. Аракелян, Л.П. Тер-Тадевосян, Л.А. Ераносян, Р.М. Симонян, М.А. Симонян, А.А. Галоян. Регулирующее действие богатого пролином полипептида на уровни фракций изоформ цитохрома b₅₅₈ кислого характера в клеточных мембранах, митохондриях и ядрах после фармакологической десимпатизации крыс 6-гидроксидопамином. // *Вопросы теоретической и клинической медицины*, 2009, Т. 12 (4), С. 12-17.
3. Л.П. Тер-Тадевосян, Л.В. Саркисян, Л.А. Ераносян, академик А.А. Галоян. Новые данные о наличии нейрогуморальной оси нейросекреторный гипоталамус-костный мозг. Участие N.Paraventricularis в регуляции активности углеводно-фосфорного обмена в селезенке и костном мозге белых крыс. // *Доклады НАН Армении*, 2011, Т.111 (1), С. 38-43.
4. Л.П. Тер-Тадевосян, Л.Н. Аракелян, Л.А. Ераносян, А.А. Галоян. Изменение активности щелочной фосфатазы и неорганической пирофосфатазы в разных органах белых крыс под влиянием Галармина. // *Материалы конференции “Физиологические механизмы регуляции деятельности организма” НАН РА*, 2012, С.321-325.
5. Л.П. Тер-Тадевосян, Л.Н. Аракелян, Л.А. Ераносян, С.Г. Чаилян, А.А. Галоян. Поиск нейрогуморальных путей регуляции активности гликоген-фосфоорилазы тканей крыс при участии ПБП-1. // *Медицинская наука Армении НАН РА*, 2013, Т. LIII (2), С. 54-60.
6. Л.А. Ераносян. Молекулярные механизмы сопряжения нейрогормона PRP-1 с аденилатциклазной сигнальной системой. // *Кровь*, 2013, Т. 1 (15), С. 84-89.

Тезисы:

7. Л.П. Тер-Тадевосян, Л.В. Саркисян, Л.А. Ераносян, А.А. Галоян. Фосфатазы костного мозга и селезенки, их регуляция нейропептидами. // *Кровь*, “Юбилейный выпуск посвященный 75–и летию Гематологического Центра им. профессора Р.О. Еоляна”, 2008, Т. 2 (8), С.101.
8. L.A. Yerosyan, L.P. Ter-Tatevosyan, A.A. Galoyan. New Data about the existence of hypothalamus – bone marrow neurohumoral axis. Participation of NPV in regulation of carbohydrate phosphorus metabolism in bone marrow and spleen. // *FEBS 11th Young Scientist Forum*, 2011, P.42.
9. Yerosyan L.A. FRET microscopy for real-time monitoring of cGMP induced by PRP-1. // *Young Scientists’ Conference “New aspects in molecular biotechnology and biochemistry”*, 2013, P.36.

**ՆՅՅՐՈՊԵՊՏԻԴ PRP-1-Ի ԴԵՐԸ ԱԾԽԱԶՐԱՖՈՍՖՈՐԱՅԻՆ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԳՈՐԾՈՒՄ**

ԱՍՓՈՓՈՒՄ

Ածխաջրաֆոսֆորային փոխանակության ֆերմենտների ակտիվության կարգավորման ուսումնասիրությունը օրգանիզմի տարբեր ֆիզիոլոգիական և ախտաբանական պայմաններում առանձնակի հետաքրքրություն է ներկայացնում սպիտակուցների, ճարպերի և ածխաջրերի փոխանակության ընթացքում նրանց ունեցած կարևոր ֆիզիոլոգիական նշանակության, և կլինիկայում՝ որպես տարբեր հիվանդությունների (քաղցկեղ, լյարդի և ոսկրային հիվանդություններ, նյարդային համակարգի խանգարումներ և այլն) ինֆորմացիոն մարկերներ կիրառման առումով : Ածխաջրաֆոսֆորային փոխանակության նոր կարգավորիչների որոնումը հանդիսանում է ժամանակակից կենսաբժշկության խնդիրներից մեկը: Հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պեպտիդ -1-ը (PRP-1) կազմված է 15 ամինաթթվային մնացորդներից (AGAPEPAEPAQPGVY) և ցուցաբերում է կենսաբանական ակտիվության լայն սպեկտր՝ իմունամոդուլատոր, հակառուռուցքային, նեյրոպաշտպանիչ, հակաօքսիդանտային և արյունաստեղծ: Ելնելով վերոհիշյալից, պեպտիդը առանձնակի հետաքրքրություն է ներկայացնում ածխաջրաֆոսֆորական փոխանակության կարգավորման գործում ինչպես առողջ, այնպես էլ ախտահարված օրգանիզմում: Ուսումնասիրվել է պեպտիդի ազդեցությունը ֆոսֆոմոնոէսթերազների (հիմնային և թթու ֆոսֆատազներ) և գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության կարգավորման գործում առնետների արյունաստեղծ հյուսվածքներում (ոսկրածուծ և փայծաղ) նեյտրոպենիայի և դեղաբանական դեսիմպատիզացման ժամանակ: Ըստ կատարված ուսումնասիրությունների, պաթոգենեզի զարգացմանը զուգընթաց, թաղանթների վնասման աստիճանից և օրգանիզմում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսների ընկճումից կախված, թիրախ հյուսվածքներում հետազոտվող ֆերմենտները ենթարկվում են փոփոխությունների: 6- հիդրօքսիդոպամինով առնետների ծայրամասային դեսիմպատիզացման ժամանակ, երբ խանգարվում են օրգանիզմի նեյրոհումորալ ֆունկցիաները, PRP-1-ի ներորովայնային ներարկումը խթանում է գլիկոգենի ճեղքումը արյունաստեղծ հյուսվածքներում: Գլիկոգենոլիզի արդյունքում առաջացած գլյուկոզ-1-ֆոսֆատը ներգրավվում է գլիկոլիզի մեջ՝

վերականգնելով ԱԵՖ-ի պաշարները, որոնք անհրաժեշտ են բջջի նորմալ կենսագործունեությունը ապահովելու համար: Մինևույն ժամանակ, այս փորձերում, էկզոգեն պեպտիդը չէր ազդում ֆոսֆատազների ակտիվության վրա: Ցիկլոֆոսֆամիդը լինելով ցիտոստատիկ-ինունոդեպրեսանտ, ցուցաբերում է խիստ իմունաընկճող ազդեցություն՝ հանգեցնելով նեյտրոպենիայի: Այս պաթոլոգիային ուղեկցող նյութափոխանակման խանգարումների ժամանակ PRP-1-ը, կարգավորելով հետազոտվող ֆերմենտների ակտիվությունը, ցուցաբերում է պաշտպանիչ հատկություններ: Պեպտիդի ներարկումից հետո, 11 օրվա ընթացքում դիտվում է ֆերմենտների ակտիվության միտում դեպի ստուգիչ ցուցանիշներ: Այս հանգամանքը հիմք է տալիս ենթադրելու, որ PRP-1-ի միջոցով հնարավոր է ածխաջրաֆոսֆորային փոխանակության հետ կապված մի շարք ախտածին վիճակներում ուղղորդված կերպով ազդել նյութափոխանակման վրա՝ նպաստելով օրգանիզմի նորմալ կարգավիճակի վերահաստատմանը: Հիպոթալամուսի պարավենտրիկուլյար կորիզների գրգռման արդյունքում ֆոսֆոմոնոէսթերազների և գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության տեղաշարժերի վերլուծումը հաստատել է հիպոթալամուսի և ոսկրածուծի միջև կապի առկայությունը: Այս փաստը թույլ է տալիս ենթադրելու սթրեսի հետևանքով PRP-1-ի սինթեզի և պարավենտրիկուլյար կորիզներից արտազատման խթանման մասին, ինչը հետագայում ուղեկցվում է օրգանիզմի հորմոնալ կարգավորման մեջ նրա ներգրավվմամբ: Աշխատանքում ուսումնասիրվել են PRP-1-ի կողմից գլիկոգենի փոխանակման կարգավորման մեխանիզմի որոշ կողմեր թիրախ-հյուսվածքներում: Այս հանգամանքը հնարավորություն կտա գտնելու գլիկոգենի ձեղքման առանցքային ֆերմենտի՝ գլիկոգենֆոսֆորիլազի կարգավորման այլընտրանքային ուղիներ: Ադենիլատցիկլազի ինհիբիտորի օգտագործումը թույլ է տալիս ենթադրել, որ լյարդում PRP-1-ը մասնակցում է գլիկոգենի փոխանակման կարգավորմանը ոչ ադենիլատցիկլազային ճանապարհով: Ֆլյուորեսցենտային էներգիայի ռեզոնանսային փոխանցման (FRET) մեթոդի կիրառմամբ փորձերը նույնպես հաստատել են այս տեսակետը, որը վկայում է նեյտրոպեպտիդի կողմից գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության ձկուն կարգավորման մասին և հիմքեր տալիս այն ընդգրկելու գլիկոգենի ձեղքումը կարգավորող հորմոնների ցանկում: Այսպիսով, PRP-1 -ը օրգանիզմի մի շարք ախտածին վիճակներում հանդիսանում է ածխաջրաֆոսֆորային փոխանակության կարգավորիչ: Այս տվյալները ճանապարհ են հարթում բժշկության մեջ PRP-1 -ի գործնական կիրառման համար ածխաջրաֆոսֆորային փոխանակության ֆերմենտների ակտիվության կարգավորման գործում նոր դեղանյութերի մշակման ուղղությամբ:

**THE ROLE OF NEUROPEPTIDE PRP-1 IN THE REGULATION OF
CARBOHYDRATE-PHOSPHORUS METABOLIC ENZYME ACTIVITIES**

SUMMARY

The study of the regulation of enzyme activity involved in carbohydrate-phosphorus metabolism in various physiological and pathological conditions of the organism is of particular interest in terms of their functional significance in the metabolism of proteins, fats and carbohydrates, as well as in regard to their widespread use in the clinic as informative biomarkers for various diseases (nervous system, liver, bone diseases, cancer etc). Searching for new regulators is one of the most pressing issues in biomedical research.

Hypothalamic proline-rich peptide-1 (PRP-1), consisting of 15 amino acid residues (AGAPEPAEPAQPGVY), displays a wide range of biological effects, such as immunomodulatory, antitumour, neuroprotective, hematopoietic and is of particular interest in the regulation of carbohydrate-phosphorus metabolism in diseased and healthy organisms.

In this respect we investigated the effect of PRP-1 on the activity of phosphomonoesterases (alkaline and acid phosphatase) and glycogen phosphorylase in hematopoietic tissues (bone marrow and spleen) of neutropenic rats and rats that have undergone pharmacological sympathectomy. It is estimated that during the development of pathogenesis, depending on the level of membrane damage and degree of impairment of oxidative phosphorylation, enzymes in target tissues undergo multidirectional changes.

Intraperitoneal injection of PRP-1 to rats with disordered neurohumoral functions, due to pharmacological sympathectomy with 6-OHDA, stimulates glycogen breakdown. The primary product of glycogenolysis is glucose 1-phosphate, which then gets involved in glycolysis, restoring ATP stores, required to maintain cell viability. However, in these experiments, exogenous peptide did not affect the phosphatase activity.

Cyclophosphamide, a well-known cytostatic-immunosuppressant, was used to induce neutropenia. In this complex picture of cyclophosphamide-induced hemo- and immunosuppression, PRP-1 displays protective properties by modulating the activity of the enzymes. Within 11 days after peptide injection, an obvious tendency to normalization of enzyme activity toward control values was observed. We assumed that in pathological conditions associated with the carbohydrate-phosphorus metabolism, it is possible to directly change certain metabolic processes by PRP-1, contributing to the restoration of healthy status of the organism.

Analyzing changes in phosphomonoesterase and glycogen phosphorylase activity after stimulation of hypothalamic paraventricular nuclei, a connection between the hypothalamus and the bone marrow was established. This fact suggests the synthesis and release of PRP-1 from the hypothalamic nuclei and involvement into the hormonal regulation.

This work elucidated the mechanism of PRP-1 action on glycogen metabolism in target tissues. It could also identify alternative pathways for glycogen regulation - the main enzyme of glycogen breakdown. Based on data, we assume that in hepatic tissue the regulatory effect of PRP-1 on glycogen metabolism is exerted without adenylate cyclase.

FRET measurements of intracellular cAMP concentrations also confirmed that the peptide acts bypassing adenylyl cyclase system. This fact suggests a flexible coordination of glycogen metabolism by neuropeptide PRP-1 and gives reason to include it in a number of hormones that control the breakdown of glycogen. Based on data-sets, we conclude hypothalamic PRP-1 to be a regulator of carbohydrate-phosphorus metabolism in a number of pathological conditions. These data reveal the practical application of PRP-1 in biomedicine for the development of a new class of drugs that target enzymes of carbohydrate-phosphorus metabolism.