



Биол. журн. Армении, 4 (71), 2019

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОЛИНОМ БОГАТОГО ПЕПТИДА НА
АКТИВНОСТЬ АТФАЗЫ И ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ
В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС РАЗНЫХ
ВОЗРАСТОВ ПРИ КОРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННЫХ
ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ПРИПАДКАХ**

**Л.Г. ПОГОСЯН¹, Ж.И. АКОПЯН¹, А.С. МАРГАРЯН²,
Р.Б. БАДАЛЯН², А.А. СИМОНЯН²**

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Институт биохимии им. Г.Бунятына НАН РА

В группах с применением коразола и пролином богатого полипептида и коразола наблюдается подавление активности ПНФ в обоих органах. Активность ПНФ в печени крыс оказалась устойчивой к действию вышеназванных соединений. Сдвиги в каталитической активности АТФаз в митохондриях мозга у белых крыс трех разных возрастов (3-, 6- и 9- мес.) при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах неоднозначны.

*Пролином богатый полипептид – пури nukлеозидфосфорилаза – АТФазы –
коразол – активность*

Կորազոլ և միաժամանակ պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ ու կորազոլ ստացած խմբերում դիտվում է ՊՆՖ-ի ակտիվության ճնշում արյան շիճուկում և գլխուղեղի միտոքոնդրիումներում: Պարզվել է, որ առնետների յարդում ՊՆՖ-ի ակտիվությունը վերը նշված պատրաստանյութերի նկատմամբ կայուն է: Սպիտակ առնետների երեք տարբեր տարիքային խմբերում (3, 6 և 9 ամսական) գլխուղեղի միտոքոնդրիումների ԱԵՖազների կատալիտիկ ակտիվության տեղաշարժերը կորազոլով մակածված էպիլեպսանման նոպաների ժամանակ միատիպ չեն:

*Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ – պուրինոկլետոգիդֆոսֆորիլազ – ԱԵՖազներ –
կորազոլ – ակտիվություն*

In groups with using corazole and proline rich polypeptide and corazole, inhibition of PNP activity in both organs was observed. As for the properties of PNP in the liver of the rats, the enzyme proved to be resistant to the above mentioned preparations. In the catalytic activity of ATPases in the mitochondria of the brain in white rats of three different ages (3, 6 and 9 months) during corazole-induced epileptiform seizures were ambiguous.

*Proline-rich peptides – purine nucleoside phosphorylase – adenosine triphosphatase –
corazole – activity*

Актуальность изучения эпилепсии обусловлена высоким уровнем заболеваемости [1, 15, 16]. Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие молекулярные факторы врожденного иммунитета, защищающие организм от инфекций и развития опухолей [17, 11]. Одним из основных направлений исследования АМП в последнее время стало изучение молекулярных и клеточных механизмов их биологической активности, обеспечивающих участие АМП в реализации защитных функций организма [2, 9, 12]. В ходе данного исследования оценивалась возможность

использования пролин-богатого полипептида в качестве возможного регулятора активности ПНФ.

В настоящей работе использованы АМП с высоким содержанием пролина – пролином богатый пептид (ПБП). Пурипнуклеозидфосфорилаза (пурипнуклеозид: ортофосфатрибозил трансфераза – ПНФ, КФ 2.4.2.1.) является одним из важнейших ферментов, характеризующих иммунный статус организма [10, 4]. Поскольку литературные данные относительно влияния ПБП на ПНФ практически отсутствуют, целью настоящей работы являлось исследование влияния ПБП на активность ПНФ в некоторых органах крыс разного возраста. Для решения поставленной задачи мы попытались оценить токсичность коразола на активность ПНФ и изучить сравнительное влияние ПБП в комбинации с коразолом и без коразола на активность ПНФ в сыворотке крови, в митохондриях мозга и печени крыс. Также представляло интерес исследование влияния ПБП на возрастные сдвиги каталитической активности Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- -АТФаз в митохондриях мозга белых крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных припадках.

Материал и методика. В эксперименте были использованы 20 беспородных белых крыс-самцов массой 180-200 г, разных возрастов (3-х, 6-ти и 9-месячные), содержащихся на стандартной диете, при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали принятым одноразовым внутримышечным введением коразола из расчета 8 мг на 100 г массы животного.

Подопытные животные были разделены на 4 группы по пять в каждой:

1. Контрольная группа – животным вводили 1 мл физраствора;
2. Опытная группа II – животным в течение 2 дней вводили ПБП из расчета 1 гамма в 1 мл физраствора один на 100 г массы животного раз в день;
3. Опытная группа III – крысам вводили коразол из расчета 8 мг на 100 г массы животного в 1 мл физраствора;
4. Опытная группа IV – животным в течение 2 дней вводили ПБП из расчета 1 гамма ПБП в 1 мл физраствора на 100 г массы животного один раз, а в день проведения эксперимента вводили коразол 8 мг на 100 г массы животного в 1 мл физраствора.

В III опытной группе эпилептиформные припадки, вызванные коразолом, проявлялись уже через 12-14 мин. после введения препарата, в то время как в группе IV через 20-25 мин наблюдались слабые проявления судорожного припадка. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine R.J. [14].

Об активности АТФаз судили по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата. $R_{неорг.}$ определяли по Лоури и Лопес в модификации Скулачева [6, 7] и пересчитывали на мг белка [13]. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического теста Спирмена. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента. Для определения активности ПНФ использован колориметрический метод с реактивом Фолина. Измерения проводили спектрофотометрически, используя кварцевые кюветы с длиной пробега 1 см, при длине волны 750 нм [5].

Для статистической обработки данных по ПНФ использовали пакет SPSS (Statistical Package for Social Science). Характер распределения полученных данных определяли по критерию Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ проводили с использованием непараметрического теста Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

В работе были использованы рефрижераторная центрифуга, спектрофотометр LKB Biochrom ULTROSPECII (Швеция), рН-метр PL-600 фирмы msc (Израиль), гуанозин и АТФ фирмы "Sigma".

Результаты и обсуждение. Наличие в структуре ПБП большого количества аминокислотных остатков пролина (до 50%) обуславливает их свойство легко вступать во взаимодействие с различными белковыми молекулами, в том числе участвующими в ключевых биохимических каскадах реакций, которые обеспечи-

вают функционирование иммунной системы [2]. Этим и обусловлен наш интерес к исследованию воздействия ПБП на ПНФ, фермент, который катализирует обратимую реакцию фосфорилиза пуриновых (дезоксир)ибонуклеотидов с образованием (d)Rib-1-P и соответствующих оснований, которые являются основным источником синтеза пуринов в клетке [4].

Результаты наших исследований указывают на определенные изменения в активности ПНФ в сыворотке крови, печени и мозге крыс разных возрастных групп при воздействии на них ПБП, коразола, а также их совместном введении. Оценку действия исследуемых соединений проводили на основании сравнения уровней активности фермента в вышеуказанных органах животных опытных групп с контрольной группой всех возрастов.

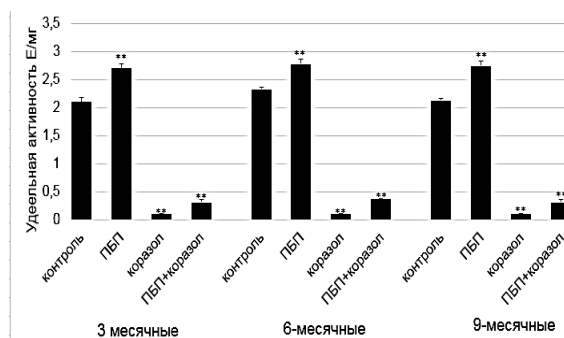


Рис. 1. Динамика изменений активности ПНФ в сыворотке крови 3-х, 6-ти и 9-месячных крыс под воздействием ПБП, коразола и ПБП+коразол.

Примечание:** - Отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.01$

Из рис. 1 следует, что во всех трех возрастных категориях динамика изменения активности ПНФ в сыворотке крови по группам схожая, а именно: в группе, где вводили ПБП активность ПНФ немного повышается, при введении коразола резко понижается до следовых значений, а в группе с совместным введением ПБП и коразола активность фермента немного увеличивается, оставаясь при этом в подавленном состоянии. При оценке результатов влияния используемых нами препаратов ПБП, коразола и ПБП+коразол на активность ПНФ в сыворотке крови было показано, что фермент оказался очень чувствительным к их действию. Повышение активности ПНФ в группе с ПБП, исходя из вышеупомянутых литературных данных, объяснимо. Резкое подавление активности в группе с коразолом, который вызывает судорожные припадки, также выглядит логично. В последней же группе, где вводится коразол совместно с ПБП активность фермента повышается, по-видимому, благодаря именно ПБП, но при этом еще остается далека от значений уровня активности фермента контрольных животных.

На рис. 2 мы наблюдаем симметричное распределение активности ПНФ в печени по группам относительно контроля у крыс всех возрастных категорий с той лишь разницей, что у шестимесячных животных все значения активности фермента выше, чем у трех- и девятимесячных. Следует отметить понижение активности ПНФ в группе с введением только ПБП у животных всех возрастов. Действие ПБП и коразола на печень вызывает интерес, т.к. этот орган характеризуется резистентностью к различного рода воздействиям [5].

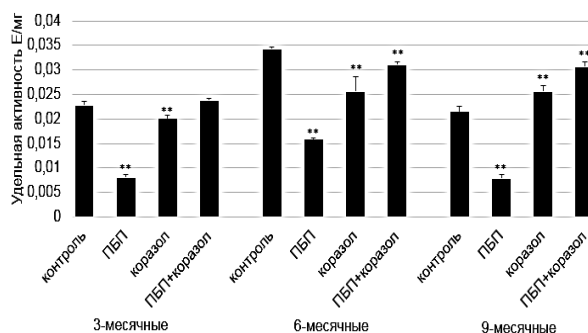


Рис. 2. Динамика изменений активности ПНФ в митохондриях печени 3-х, 6-ти и 9-месячных крыс под воздействием ПБП, коразола и ПБП+коразол.

Примечание: ** - Отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.01$

В данной работе (рис.2) этот тезис подтверждается в отношении двух групп: с коразолом и ПБП+коразол, где значения активности ПНФ остаются на уровне активности фермента контрольной группы. Возможно, используемая концентрация коразола оказалась недостаточной для воздействия на печеночную ткань. При этом необходимо отметить, что, согласно литературным данным, влияние ПБП на различные ферменты в разных органах крыс в условиях *invitro* также неоднозначно [8]. Возникает вопрос, каким механизмом осуществляется их регуляция и какова природа фактора, блокирующего или активирующего ферментативную активность. Показано, что ПБП – галармин и его производные, являясь стимуляторами неорганической пироглутаматазы в печеночной ткани крыс, в мозговой ткани выступают в роли ее ингибитора. Действие тех же пептидов на щелочную фосфатазу выявило ее активацию в печеночной ткани и ингибирование в почечной [8].

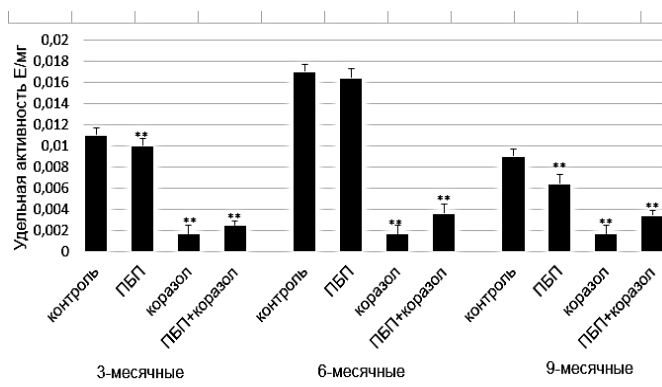
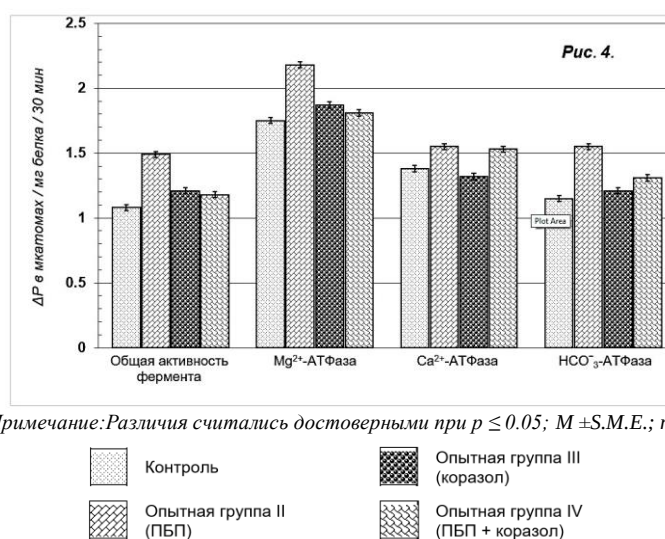


Рис. 3. Динамика изменений активности ПНФ в митохондриях мозга 3-х, 6-ти и 9-ти месячных крыс под воздействием ПБП, коразола и ПБП+коразол.

Примечание: ** - Отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.01$

Данные, полученные из мозга крыс, представлены на рис. 3. Уровень активности ПНФ в группе с применением ПБП достаточно высок и приближается к значениям активности фермента контрольной группы. В двух других группах с коразолом и ПБП+коразол наблюдаем ту же картину, что и в сыворотке крови, а именно: в группе с коразолом активность ПНФ очень низкая и в последней группе она чуть выше, но по сравнению с контролем также невелика. Данные изменений

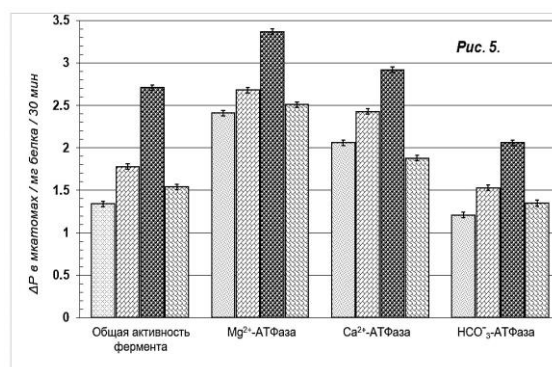
активности ПНФ, полученные в мозговой ткани (рис. 3), оказались схожи с данными сыворотки крови, с небольшой разницей, касающейся группы с применением ПБП: у животных всех возрастов уровни активности ПНФ в сыворотке крови под действием ПБП немного повышаются, а в мозге, наоборот, имеет тенденцию к понижению, оставаясь близкими к значениям контрольной группы. В мозге также, как мы отмечали выше, в печени, у шестимесячных животных довольно высокая активность ПНФ и в контрольной группе, и в следующей с использованием ПБП. Было показано [3], что ПБП обладает центральным и периферическим иммуномодуляторным действием, регулирует процессы свободнорадикального окисления, что, в целом свидетельствует о нейропротекторной роли гипоталамического пролин богатого нейроморона.



Примечание: Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$; $M \pm S.M.E.$; $n=9$.

Рис. 4. Влияние ПБП на активность Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- -АТФаз в митохондриях мозга 3-месячных белых крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах.

На рис. 4 приведены результаты экспериментов по изучению сдвигов активности АТФаз в intactных митохондриях мозга 3-месячных крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах под воздействием ПБП. Показано, что у 3-месячных белых крыс, получивших внутривенно только ПБП, наблюдается стимуляция активности фермента во всех изученных АТФазах. При введении только коразола для стимулирования эпилептиформных припадков каталитическая активность Ca^{2+} -АТФазы незначительно угнетается по сравнению с контролем. В тех же условиях каталитическая активность общей, Mg^{2+} - и HCO_3^- -АТФаз по сравнению с контролем незначительно повышается. Однако у группы 3-месячных белых крыс, предварительно получивших ПБП, наблюдается незначительное повышение каталитической активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -АТФаз по сравнению с контролем. Активность же общей и Mg^{2+} -АТФаз также незначительно угнетена.



Примечание: Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$; $M \pm S.M.E.$; $n=9$.

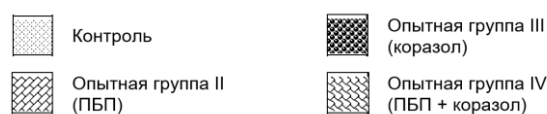
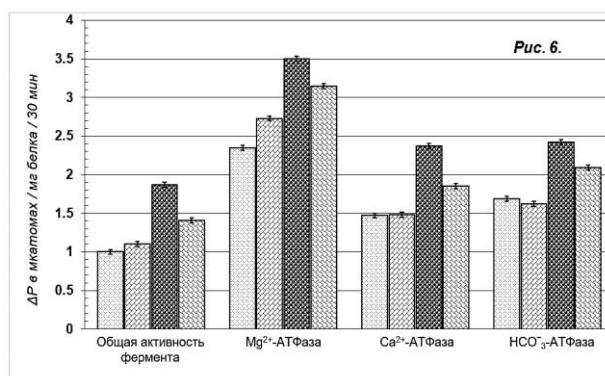


Рис. 5. Влияние ПБП на активность Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и $НСО_3^-$ -АТФаз в митохондриях мозга 6-месячных белых крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах.

В условиях нашего эксперимента иная картина наблюдается у 6- и 9-месячных белых крыс. У экспериментальных животных 6-месячных белых крыс (рис. 5) под влиянием как ПБП, так и коразола, активность АТФаз заметно повышается по сравнению с контрольными пробами: каталитическая активность изученных АТФаз стимулируется. Такая же картина наблюдается у 9-месячных белых крыс (рис. 6), получавших только ПБП или только коразол. Предварительное внутрибрюшинное введение ПБП приводит к угнетению активности изученных ферментов. Данные этой группы приближаются к контрольным показателям, что свидетельствует о коррелирующем влиянии ПБП.



Примечание: Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$; $M \pm S.M.E.$; $n=9$.



Рис. 6. Влияние ПБП на активность Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и $НСО_3^-$ -АТФаз в митохондриях мозга 9-месячных белых крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах

Изучение сдвигов активности АТФаз в интактных митохондриях мозга показали, что при введении ПБП в изолированных интактных митохондриях головного мозга белых крыс в возрастном аспекте заметно активируются Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимые АТФазы. Такие же сдвиги наблюдаются под влиянием эпилептогена коразола. Однако при совместном введении ПБП и коразола активность изученных ферментов ингибируется по сравнению с показателями групп животных, получивших только коразол. В отличие от группы 3-месячных белых крыс, в группе 6- и 9-месячных белых крыс под влиянием совместного введения животным ПБП и коразола полученные сдвиги каталитической активности АТФаз достоверно нивелируются, приближаясь к контрольным показателям.

Исходя из полученных результатов, можно допустить, что ПНФ в сыворотке крови и в мозге крыс оказалась весьма чувствительной к действию использованных нами препаратов, а в печени, наоборот, фермент проявил резистентные свойства.

Сдвиги в каталитической активности АТФаз в митохондриях мозга у белых крыс трех разных возрастов (3-, 6- и 9-месячных) при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах неоднозначны. Выяснилось, что у 3-, 6- и 9-месячных белых крыс в группах, получивших только коразол, происходит повышение каталитической активности изученных ферментов, за исключением Ca^{2+} -зависимой АТФазы у 3-месячных, где наблюдается ингибирование активности фермента. При профилактическом введении ПБП во всех возрастных группах наблюдается торможение каталитической активности фермента по сравнению с группой животных, получивших только коразол.

Список сокращений

ПБП – пролин богатый пептид
ПНФ – пурииннуклеозидфосфоорилаза
АТФаза – аденозинтрифосфатаза
АМП – антимикробные пептиды

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Г.Н., Бадалян О.Л., Бурд С.Г., Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Крикова Е.В., Авакян Г.Г., Чуканова А.С., Стойко М.И., Савенкова А.А. Эпилепсия. Пароксизмальные состояния. Материалы Юбилейного конгресса РАМН и Минздравсоцразвития России, Российская Противоэпилептическая Лига, 2, 4, 41-54, 2010.
2. Артамонов А.Ю., Рыбакина Е.Г., Орлов Д.С., Корнева Е.А. Биологическая активность и молекулярно-клеточные механизмы действия антимикробных пептидов человека и животных, Фундаментальная наука и клиническая медицина. Вестник Санкт-Петербургского университета, Сер. 11. Вып. 1, 5-25, 2014.
3. Ваградян А.Г., Агаджанов М.И. Новые механизмы нейрогормональной регуляции в условиях нейродегенерации, Новый Армянский Медицинский Журнал, 3, 1, 6-28, 2009.
4. Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Пурииннуклеозидфосфоорилаза, Биомедицинская химия, 59, Вып. 5, 483-497, 2013.
5. Погосян Л.Г., Мкртчян З.С., Газарянц М.Г., Акопян Ж.И. Влияние электромагнитного излучения с частотой 900 и 1800 МГц на активность пурииннуклеозидфосфоорилазы и щелочной фосфатазы в некоторых органах крыс, Медицинская радиология и радиационная безопасность, 61, 6, 5-10, 2016.
6. Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Симонян Л.А., Степанян Р.А., Галоян А.А. Влияние нового гипоталамического полипептида цитокина на Mg^{2+} - и Ca^{2+} -активируемые АТФазы тканей крыс, Нейрохимия, 19, 2, 143-145, 2002.

7. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. М., Наука, 564 с., 1989.
8. *Тер-Тадевосян Л.П., Саркисян Л.В., Асланян И.Г., Галоян А.А.* Действие галармина и его производных на активность неорганической пирофосфатазы и щелочной фосфатазы органов белых крыс, Доклады НАН РА, 104, 228-233, 2004.
9. *Шамова О.В., Орлов Д.С., Пазина Т.Ю., Жаркова М.С.* Изучение молекулярно-клеточных основ цитотоксического действия антимикробных пептидов на опухолевые клетки, Фундаментальные исследования, № 15 (часть 1), 207-212, 2012.
10. *Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D.* Purin nucleoside phosphorilase: properties, functions and clinical aspect, Pharmacol. & Therapeut., 88, 3, 349-425, 2000.
11. *Greer A., Zenobia C., Darveau R.P.* Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium, Periodontol., 63, 1, 67-79, 2013.
12. *Kurosaka K., Chen Q., Yarovsky F., Tokunaga A.* Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant, J. Immunol., 174, 6257-6265, 2005.
13. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the folin-phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1991.
14. *Racine R.J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures, Electroencephal. Clin. Neurophysiol., 32, 281-294, 1972.
15. *Vinogradova L.V., Shatskova A.B.* Lateral asymmetry of early seizure manifestations in experimental generalized epilepsy, Neuroscience, 213, 133-143, 2012.
16. *Wolf P.* Historical aspects of idiopathic generalized epilepsies, Epilepsia, 46, suppl. 9, 7-9, 2005.
17. *Yeung A.T., Gellatly S.L., Hancock R.E.* Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications, Cell. Mol. Life Sci., 68, 13, 2161-2176, 2011.

Поступила 09.07.2019