



ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԵՍ  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ  
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

ՀԱՏՈՐ LXVI, հավելված 1, 2014

*Ակադեմիկոս Ա.Ա. Գալոյանի*  
ծննդյան 85-ամյակին նվիրված  
Երիտասարդ գիտնականների գիտաժողովի  
գիտական հոդվածների ժողովածու

Մայիսի 12-13, Երևան, ՀՀ

ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բունիաթյանի անվ.  
Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

ՀՀ ԳԱԱ «Գիտություն» հրատարակչություն

Լույս է տեսնում 1948 թվականից, հոդվածները հրատարակվում են հայերեն,  
ռուսերեն կամ անգլերեն լեզուներով

Выходит с 1948 года, статьи публикуются на армянском, русском  
или английском языках

Journal is published since 1948, the articles are published in Armenian,  
Russian or English

---

ԽՍՀՄ ԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս. Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Ս. Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Ս. Բոյաճյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*),  
Ա.Յ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Ա. Գևորգյան, Ա.Յ. Թռչունյան,  
Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՍՀՄ ԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Յ. Գաբրիելյան, Ս.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան,  
Վ.Պ. Հակոբյան, Վ.Գ. Դարագյոզյան, Ա.Յ. Սովսեսյան, Կ.Ա. Պողոսյան, Գ.Յ. Փանոսյան,  
Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ռ.Ս. Բարությունյան (*заместитель главного редактора*),  
Ա.Ս. Բояджян (*заместитель главного редактора*),  
Ա.Գ. Եсаян (*ответственный секретарь*), Զ.Ա. Վարդանյան, Գ.Ա. Գևորգյան,  
Ս.Х. Маїрапетян, Ա.Ր. Մանվելյան, Ա.Ա. Թրչունյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Յ.Ս. Ակոպյան, Զ.Ի. Ակոպյան, Յ.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան,  
Վ.Ս. Գաբրիելյան, Մ.Ա. Դավթյան, Կ.Գ. Կարագեզյան, Ս.Օ. Մովսեսյան,  
Լ.Լ. Օսիպյան, Գ.Ա. Փանոսյան, Կ.Ս. Սովոսյան.

THE EDITORIAL BOARD

*Editor in chief:* E.S. Gevorgyan, *Vice-editors:* R.M. Aroutiunian, A.S. Boyadjyan,  
*Secretary-in-charge:* A.H. Yesayan, *Members of the Board:* G.A. Gevorgyan,  
L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchounian,  
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

E.G. Afrikyan, Yu.T. Aleksanyan, M.A. Davtyan, E.Ts. Gabrielyan,  
V.P. Hakobyan, Zh.I. Hakobyan, K.G. Karagiozyan, S.H. Movsesyan,  
L.L. Osipyan, G.H. Panosyan, K.S. Poghosyan.

**«ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԱՅ»** -ի էլեկտրոնային տարբերակը  
և հեղինակների համար կանոնները գտնելված են հետևյալ կայքէջում  
<http://www.flib.sci.am/eng/Biology/>

Խմբագրության աշխատակիցներ՝  
Ափինյան Ն.Հ., Իսահակյան Շ.Հ., Սարգսյան Է.Գ.  
Խմբագրության հասցեն՝ 0019, Երևան, Մարշալ Բաղրամյան պ. 24 գ, սենյակ 11,  
Հեռ. 010 58 01 97; 010 57 21 19, E-mail: [bj@ysu.am](mailto:bj@ysu.am)

Сотрудники редакции:  
Апинян Н.А., Исаакян Ж.Г., Саркисян Э.Г.  
Адрес редакции: 0019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна 24 г, комната 11,  
Тел. 010 58 01 97; 010 57 21 19, E-mail: [bj@ysu.am](mailto:bj@ysu.am)

Staff of Editorial office:  
Apinyan N.H., Isahakyan Zh.H., Sargsyan E.G.  
Address of Editorial office: 0019, Yerevan, Marshal Baghramyan pr. 24 g, room 11,  
Tel. 010 58 01 97; 010 57 21 19, E-mail: [bj@ysu.am](mailto:bj@ysu.am)

Հրատ. պատվերի № 536  
Ստորագրված է տպագրության՝ 02.09.2014թ.  
Թուղթը՝ օֆսեթ. № 1:  
7 տպ.մամուլ: Տպաքանակ՝ 100 :  
ՀՀ ԱԱ «Գիտություն» հրատարակչության տպարան:  
0019, Երևան, Մարշալ Բաղրամյան պ. 24:

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Հայաստանի հանրապետության Գիտությունների ազգային ակադեմիայի ակադեմիկոս<br>Ա.Ա. Գալոյանի 85-ամյակին .....                                                                                                                                                                                                                            | 7   |
| <b>•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
| Աստուկյան Ա.Ա., Շարոյան Ս.Գ., Հարոյան Ա.Ա., Հարությունյան Ռ.Դ., Մարդանյան Ս.Ս.<br>Սինովյալ հեղուկում ադենոզինդեամինազի ակտիվության ընկճումը սինթեզված<br>միացություններով և բուսական պատրաստուկներով .....                                                                                                                         | 13  |
| Բադալյան Ա.Ս., Բադալյան Խ.Վ., Չախլյան Ս.Գ. Իմունատրոպ պատրաստուկների<br>կիրառման դեպքում IL 7-ռեցեպտորային բջիջների քանակական ցուցանիշների<br>համահարաբերակցական վերլուծություն .....                                                                                                                                              | 20  |
| Գալոյան Գ.Ս., Ղազարյան Պ.Ա. Թաղանթային ֆոսֆոլիպիդների մակարդակը և լիպիդների<br>գերօքսիդացման ակտիվությունը սարկոմա-45-ի ժամանակ և ցիան-պարունակող<br>լակտոնների նոր ածանցյալի օգտագործումից հետո .....                                                                                                                             | 24  |
| Ղանիբեյան Զ.Է. Նոր մանրամասներ ԶՕՌ ֆերմենտի գործունեության մասին, որը<br>հանդիսանում է օքսիդատիվ և հակաօքսիդանտային հավասարակշռված<br>համակարգերի մի մաս .....                                                                                                                                                                     | 30  |
| Ղազարյան Պ.Ա., Կարազուլյան Ն.Ս. Նոր ցիան խումբ պարունակող չիազեցած լակտոնի<br>ածանցյալի ազդեցությունը փայծաղի բջջաթաղանթների ֆոսֆոլիպիդային<br>ցիկլի բաղադրիչների մետաբոլիզմի վրա սարկոմա-45-ի ժամանակ .....                                                                                                                       | 43  |
| Ղազարյան Շ., Բաբայան Ն., Գրիգորյան Ռ., Սարգսյան Ն., Պողոսյան Դ., Ֆարմազյան Չ.,<br>Առակելովա Է. Ցիսպլատինի հիման վրա նոր նանոչափսային միացությունների<br>հակաքաղցկեղային ակտիվության ուսումնասիրությունը in vitro պայմաններում .....                                                                                                | 49  |
| Մաթևոսյան Մ.Բ., Հարությունյան Տ.Պ., Ղուրդարյան Ա.Ա. Հիպոթալամուսի պրոլինով<br>հարուստ պոլիպեպտիդ Galermin -ի (PRP-1) հակաբորբոքային ազդեցությունը LՊՍ-ով<br>հարուցված էնդոտոքսիկ շոկի դեպքում .....                                                                                                                                | 56  |
| Մկրտչյան Մ.Ս. Սալմոնելոզի ժամանակ միկրոֆլորայի խախտումները շճատեսակ<br>սպեցիֆիկ են .....                                                                                                                                                                                                                                           | 62  |
| Մարգարյան Մ.Ա., Գրիգորյան Ս.Լ.Արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկության որոշումը<br><i>Clostridium perfringens</i> -ի նկատմամբ .....                                                                                                                                                                                                      | 68  |
| Մեֆերյան Թ.Ե. <i>Heracleum sosnovskyi</i> Manden բույսի ֆտոտենսիբիլիզացնող<br>ազդեցությունը թաղանթային լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վրա .....                                                                                                                                                                                 | 73  |
| Ա.Ա. Սիմոնյան, Ռ.Ա. Սիմոնյան, Ա.Ս. Մարգարյան, Լ.Ա. Սիմոնյան, Ռ.Բ. Բադալյան, Մ.Ս.<br>Գուրզուլյան $\text{Ca}^{2+}$ -կախյալ ԱԵՖազի ակտիվության փոփոխությունները և SkQ1-ի<br>ազդեցությունը սպիտակ առնետների տարբեր օրգանների միտոքոնդրիումներում<br>պենտիլենտետրազոլով մակածված էպիլեպսանման ցնցումների դեպքում .....                  | 78  |
| Սիմոնյան Ռ.Ս., Շիրինյան Ս.Վ., Բաբայան Մ.Ա., Ալեքսանյան Ա.Ս., Սիմոնյան Գ.Ս.,<br>Գրիգորյան Ա.Ֆ., Ալեքսանյան Ս.Ս., Սիմոնյան Մ.Ա. Ստամոքսի քաղցկեղով<br>հիվանդների էրիթրոցիտների թաղանթների և արյան շիճուկի էկզոսոմների ՆԱԴՓԻ<br>օքսիդազի իզոմերների ակտիվությունը, արտազատման մակարդակը և<br>կոմպլեքսագոյացման ֆերիիդրոզիդի հետ ..... | 83  |
| Սրապիոնյան Ռ. Մ., Սահակյան Ֆ.Մ., Պարոնյան Չ.Խ. Հիպոթալամուսի կարդիոակտիվ<br>նեյրոհորմոնի ազդեցությունը առնետի մեկուսացված սրտի վրա .....                                                                                                                                                                                           | 89  |
| Ստեփանյան Ա.Ա., Աճեմյան Ս.Ա., Բոյաջյան Ա.Ս. Կոմպլեքսին-2 գենի rs1366116<br>պոլիմորֆիզմի առցացումը իշեմիկ կաթվածի հետ .....                                                                                                                                                                                                         | 92  |
| Տեր-Թադևոսյանը Լ.Պ., Երանոսյան Լ.Ա., Առաքելյան Լ.Ն., Չախլյան Ս.Գ. Նեյրոպեպտիդի<br>PRP-1-ով գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվացման մեխանիզմը; gԱՄՖ-ի և կալցիոլի<br>դերը ազդակի փոխանցման մեխանիզմում .....                                                                                                                                  | 97  |
| Ս.Գ. Շարոյան, Ա.Ա. Աստուկյան, Ս.Ս. Մարդանյան, Դ.Ա. Հարությունյան Ամիլինի<br>ֆիբրիլոգենեզի արգելակումը դեղաբույսերի թուրմերով և դրանց բաղադրիչներով .....                                                                                                                                                                           | 103 |

# СОДЕРЖАНИЕ

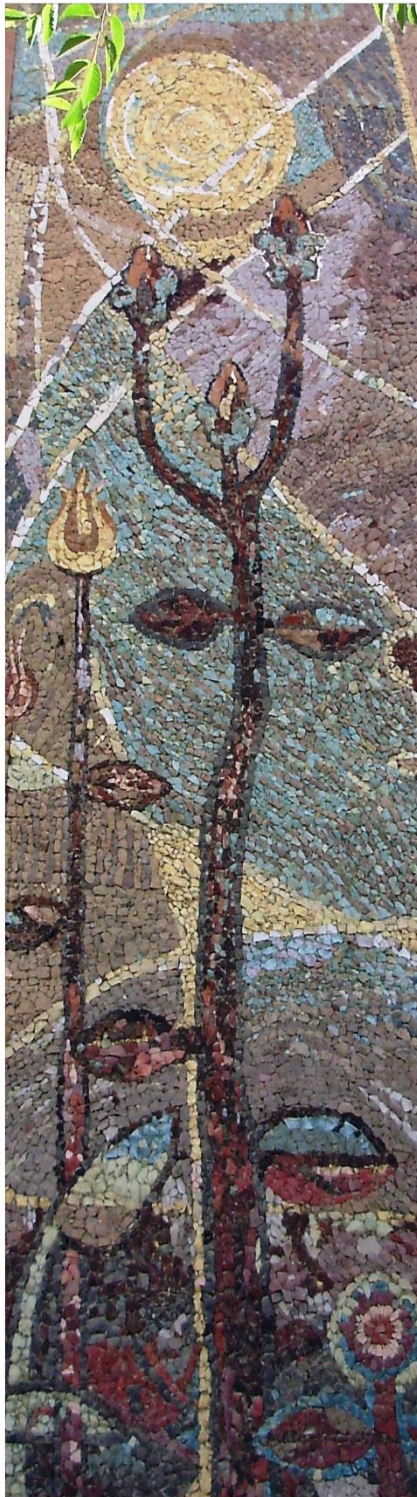
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| К 85-летию со дня рождения академика Национальной академии наук республики<br>Армения А. А. Галояна .....                                                                                                                                                                                                              | 7   |
| <b>•Экспериментальные и теоретические статьи•</b>                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
| А.А. Антонян, Шароян С.Г., Ароян А.А., Арутюнян Р.А., Мардарян С.С.<br>Ингибирование активности аденозиндезаминазы в синовиальной жидкости<br>синтетическими соединениями и растительными препаратами .....                                                                                                            | 13  |
| Бадалян А.М., Бадалян Х.В., Чалян С.Г. Корреляционный анализ количественных<br>показателей ILT-рецепторных клеток при введении иммуноотропных<br>препаратов .....                                                                                                                                                      | 20  |
| Галоян Г.М., Казарян П.А. Уровень мембранных фосфолипидов и активность<br>перекисного окисления при саркоме-45 и после применения нового<br>производного цианосодержащих лактонов .....                                                                                                                                | 24  |
| Даниелян К.Э. Новые детали относительно фермента КОР, который является частью<br>сбалансированной оксидативной и антиоксидантной систем .....                                                                                                                                                                          | 30  |
| Казарян П.А., Карагулян Н.С. Влияние нового производного цианосодержащих<br>лактонов на метаболизм компонентов фосфоинозитидного цикла мембран<br>клеток селезенки при саркоме – 45.....                                                                                                                               | 43  |
| Казарян Ш.А., Бабалян Н.С., Григорян Р.М., Саркисян Н.К., Погосян Д.А., Фармазян<br>З.М., Аракелова Е.Р. Противоопухолевая активность <i>in vitro</i> новых<br>наноразмерных композитов на основе цисплатина .....                                                                                                     | 49  |
| Матевосян М.Б., Арутюнян Т.П., Дургярян А.А. Противовоспалительный эффект<br>богатого пролином полипептида Галармина (PRP-1) при эндотоксическом<br>шоке индуцированном ЛПС .....                                                                                                                                      | 56  |
| Мкртчян М.С. Нарушения микрофлоры во время сальмонеллеза серотип<br>специфичны .....                                                                                                                                                                                                                                   | 62  |
| Саргсян М.А., Григорян С.Л. Решение защитных свойств сыворотки крови по<br>сравнению с <i>Clostridium perfringens</i> .....                                                                                                                                                                                            | 68  |
| Сеферян Т. Е. Фотосенсибилизирующий влияние борщевика Сосновского Heracleum<br>Sosnovskyi Manden на перекисное окисления мембранных липидов .....                                                                                                                                                                      | 73  |
| Симонян А.А., Симонян Р.А., Маргарян А.С., Симонян Л.А., Бадалян Р.Б., Гуроглян<br>М.М. Изменения активности $Ca^{2+}$ -зависимой АТФ-фосфогидролазы и влияние<br>антиоксиданта SkQ1 в митохондриях тканей белых крыс при<br>экспериментальных эпилептиформных судорогах .....                                         | 78  |
| Симонян Р.М., Ширинян С.В., Бабалян М.А., Алексанян А.С., Симонян Г.М., Григорян<br>А.Ф., Алексанян С.С., Симонян М.А. Активность, степень отщепления и<br>комплексообразование с ферригемоглобином изоформ NADPH оксидазы из<br>эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки пациентов, носителей рака<br>желудка ..... | 83  |
| Сратинян Р.М., Саакян Ф.М., Паронян З.Х. Исследование влияний кардиоактивного<br>нейрогормона гипоталамуса на изолированном сердце крысы .....                                                                                                                                                                         | 89  |
| Степанян А.С., Ачмян С.А., Бояджян А.С. Ассоциация полиморфизма rs1366116<br>гена комплексина-2 с ишемическим инсультом .....                                                                                                                                                                                          | 92  |
| Тер-Татевосян Л.П., Ераносян Л.А., Аракелян Л.Н., Чалян С.Г. Механизм<br>активации гликоген фосфорилазы нейропептидом ПБП-1 ; Роль цАМФ и<br>ионов $Ca^{2+}$ в передаче сигнала .....                                                                                                                                  | 97  |
| Шароян С. Г., Антонян А.А., Мардарян С.С., Арутюнян А.А. Ингибирование<br>фибриллогенеза амилина экстрактами лекарственных растений и их<br>компонентами .....                                                                                                                                                         | 103 |

# CONTENTS

|                                                                                                                       |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| On the 85th anniversary of academician A.A. Galoyan of the National Academy of Sciences the Republic of Armenia ..... | 7 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

## •Experimental and theoretical articles•

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Antonyan A.A., Sharoyan S.G., Haroyan A.A., Harutyunyan R.H., Mardanyan S.S.</i> Inhibition of adenosine deaminase activity in synovial fluid by synthesized compounds and plant preparation .....                                                                                                                       | 13  |
| <i>Badalyan A.M., Badalyan Kh.V., Chailyan S.G.</i> Correlation analysis of quantitative indicators ILT-receptor cells under the influence of immune .....                                                                                                                                                                  | 20  |
| <i>Galoyan G.M., Ghazaryan P.A.</i> The level of membrane phospholipids and peroxidation activity during sarcoma-45 and after the application of the new derivative of cyanide lactones.....                                                                                                                                | 24  |
| <i>Danielyan K.E.</i> New details regarding XOR as a part of the balanced oxidative and antioxidative systems .....                                                                                                                                                                                                         | 30  |
| <i>Ghazaryan P.A., Karagulyan N.S.</i> The influence of new cyan containing lactones derivative on metabolism of phosphoinositide cycle components of cell membranes spleen in case of sarcoma-45.....                                                                                                                      | 43  |
| <i>Kazaryan Sh., Babayan N., Grigoryan R., Sarkisyan N., Poghosyan D., Farmazyan Z., Arakelova E.</i> Antitumor activity in vitro conditions of new nanoscale composites based on cisplatin .....                                                                                                                           | 49  |
| <i>Matevosyan M.B., Harutyunyan T.P., Durgaryan A.A.</i> Anti-inflammatory effects of hypothalamic proline rich polypeptide Galarmin (PRP-1) in LPS-induced endotoxic shock .....                                                                                                                                           | 56  |
| <i>Mkrtchyan M.S.</i> Disturbances of microflora during salmonellosis are serotype specific .....                                                                                                                                                                                                                           | 62  |
| <i>Sargsyan M.A., Grigoryan S.L.</i> Solution protective properties serum compared with <i>Clostridium perfringens</i> .....                                                                                                                                                                                                | 68  |
| <i>Seferyan T. Ye.</i> Photosensitizing influence of Sosnowsky's Hogweed Heracleum Sosnovskyi Manden on lipid peroxidation in membranes .....                                                                                                                                                                               | 73  |
| <i>Simonyan A.A., Simonyan R.A., Margaryan A.S., Simonyan L.A., Badalyan R.B., Guroghlyan M.M.</i> Changes in the activity of Ca <sup>2+</sup> -dependent ATP-phosphohydrolase and the influence of antioxidant SkQ1 in mitochondria of white rats tissues at experimental epileptiform convulsions.....                    | 78  |
| <i>Simonyan R.M., Shirimyan S.V., Babayan M.A., Aleqsanyan A.S., Simonyan G.M., Grigoryan A.F., Aleqsanyan S.S., Simonyan M.A.</i> Activity, the extent of cleavage and complex formation NADPH oxidase isoforms with ferrihemoglobin of erythrocyte membranes and serum exosomes patients carriers of gastric cancer ..... | 83  |
| <i>Srapionyan R.M., Saakyan F.M., Paronyan Z.Kh.</i> The action of the cardioactive hypothalamic neurohormone on the isolated rat heart .....                                                                                                                                                                               | 89  |
| <i>Stepanyan A.S., Atshemyan S.A., Boyajyan A.S.</i> Association of the complexin-2 gene rs1366116 polymorphism with ischemic stroke .....                                                                                                                                                                                  | 92  |
| <i>Ter-Tadevosyan L.P., Yeranossyan L.A., Arakelyan L.N., Chailyan S.G.</i> Mechanism of activation of glycogen phosphorylase by neuropeptide PRP-1; Role of cAMP and Ca <sup>2+</sup> in the transmission of signals .....                                                                                                 | 97  |
| <i>Sharoyan S.G., Antonyan A.A., Mardanyan S.S., Harutyunyan H.A.</i> Inhibition of fibrinogenesis of amylin by extracts of medicinal plant and their components .....                                                                                                                                                      | 103 |



ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բունիաթյանի անվան  
Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

*Ակադեմիկոս  
Ա.Ա. ԳԱԼՈՅԱՆԻ*

Ծննդյան 85-ամյակին  
նվիրված

ԵՐԻՏԱՍԱՐԴ  
ԳԻՏՆԱԿԱՆՆԵՐԻ  
ԳԻՏԱԺՈՂՈՎ

Մայիսի 12-13,  
Երևան, ՀՀ



Биолог. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

**К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
АРМЕНА АНУШАВАНОВИЧА ГАЛОЯНА**



А.А. Галоян родился 1 мая 1929 г. в селе Анушаван Артикского района Армении в семье врача. Школу окончил с золотой медалью, а Ереванский государственный медицинский институт им. М. Гераци - с отличием. В 1956 г. защитил кандидатскую диссертацию по биохимии мозга в Институте биологии развития им. А.Н. Северцева РАН под руководством физиолога академика Х. Коштоянца, вернулся в Армению и более 50 лет работал в Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. Докторскую диссертацию защитил в 35-летнем возрасте. А.А. Галоян прошел путь от научного сотрудника, руководителя лаборатории биохимии нейрогормонов, зам. директора по науке, руководителя Отдела биохимии нейрогормонов до директора Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. В 1971 г. он был избран член-корр. АН Армении по специальности "химия физиологически активных соединений", а в 1986 г. - академиком по специальности "Биохимия".

С 1977 г. А.А. Галоян одновременно возглавлял лаборатории биохимии гормонов Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА и московский филиал института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Фундаментальные научные исследования механизмов действия гормонов и биологически активных соединений из гипоталамуса, открытых А.А. Галояном и сотр., проводились во многих научных центрах мира - Институт органической химии и биохимии (Прага), Институт нейрхимии и наркомании (Нью-Йорк), Солк Институт (Сан-Диего), Рокфеллеровский университет (Нью-Йорк), кафедра биохимии и молекулярной биологии медицинского университета (Вашингтон), Медицинский университет (Ванкувер), Институт физиологической химии (Тюбнген), Институт молекулярной биологии и Институт физиологии НАН РА, Ереванский государственный и медицинский университеты.

1995-1996 гг. Биографический институт в США назвал проф. А.А. Галояна человеком года, в 1998 г. - человеком века. В 1997 г. он был избран академиком Международной академии наук, Нью-Йоркской академии наук, почетным



---

иностранным членом ученого совета Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и академиком Академии медицинских наук Армении.

А.А. Галоян выполнял также большую научно-организационную работу, был президентом Ассоциации биохимиков Армении, председателем Специализированного совета по присуждению ученой степени доктора биологических наук по специальности "Биохимия", "Молекулярная биология" и "Генетика", членом Центрального совета Международного общества по нейрохимии, председателем Медико-биологического проблемного научного совета.

А.А. Галоян был главным редактором журнала "Нейрохимия", который был основан 1982 году Академией наук Армянской ССР, а с 1984 по 1992 г. журнал полностью переводился на английский язык. С 1992 года по настоящее время журнал издается под эгидой двух академий – Российской и Армянской. Английская версия журнала "Neurochemical Journal" издается с 2007 г.

Он уделял большое внимание не только координации различных направлений биохимии и нейробиологии, но и подготовке научных кадров. Многогранна и педагогическая деятельность проф. А.А. Галояна. Многие студенты Ереванского государственного университета и Медицинского университета им. М. Гераци помнят его содержательные лекции по биохимии, молекулярной нейрохимии и нейроиммунологии. Под его непосредственным руководством были защищены 18 докторских и более 60 кандидатских диссертаций. "Галояновская школа" по молекулярной нейроэндокринологии и нейрохимии давно известна в международном научном сообществе.

Он достойно представлял армянскую нейрохимическую науку за рубежом. На многих научных съездах он не только выступал в качестве докладчика, но и неоднократно избирался председателем различных симпозиумов и конференций по молекулярной биохимии, нейроэндокринологии и нейрохимии. А.А. Галоян внес большой вклад в развитие приоритетных направлений нейробиологии.

С именем академика А.А. Галояна связано открытие новых гормональных систем мозга. Еще в 1962 г. А.А. Галоян и сотр. выделили из гипоталамической части мозга группу нейрогормонов - регуляторов коронарного кровообращения и показали, что они являются гликопептидами сложной структуры. В 1964 г. А.А. Галояном были выявлены белки-предшественники коронарорасширяющих нейрогормонов. Через год им была выдвинута концепция генезиса полипептидных нейрогормонов, согласно которой они синтезируются на рибосомах в составе белков-предшественников, из которых затем высвобождаются под действием специфических протеолитических ферментов.

В этой связи академик Сергей Евгеньевич Северин в 1978 г. написал: "Фундаментальные открытия молекулярной нейрохимии за последние 20-30 лет коренным образом изменили представления о функциях мозга. Для развития современной молекулярной нейроэндокринологии большое значение имело открытие либеринов (релизинг-гормонов) американскими учеными и открытие кардиоактивных органотропных нейрогормонов в нашей стране проф. А.А. Галояном".

Известный нейробиолог, проф. Г. Кассиль, в своей монографии "Внутренняя среда организма" (М.: Наука, 1978. С. 52) писал о работах Р. Гильмена, А. Шали и Р. Еллоу - лауреатов Нобелевской премии за открытие релизинг-гормонов: "Наряду с ними советскому биохимику А.А. Галояну удалось выделить из гипоталамуса нейрогормоны, обладающие способностью расширять или суживать коронарные сосуды сердца".

Весьма примечательна оценка научной и организационной деятельности академика А.А. Галояна, данная президентом РАН академиком Осиповым Ю.С и вице-президентом академика Григорьевым А.И.: «Вы являетесь примером

крупного ученого, беззаветно преданного науке, внесшего большой вклад в развитие мировой нейрофизиологии и особенно ее бурно развивающегося направления – нейроиммунологии. Вы стояли у истоков развития одного из ключевых направлений интегративной физиологии – нейроэндокринологии, осуществив пионерские работы в области выделения и идентификации физиологически активных веществ, синтезируемых нейросекреторными нейронами гипоталамуса. Так, Вами были открыты кардиотропные нейрогормоны. В последние годы Вы достигли больших успехов в изучении нейроиммунных взаимоотношений и роли медиаторов иммунной системы в физиологических регуляциях на различных уровнях – от молекулярного до организменного» (2010).

Еще в 1967 г. проф. А. Галоян предложил концепцию существования "эндокринного сердца" и показал, что ганглионарные нервные клетки предсердия обладают эндокринной функцией, производят пептидные гормоны, которые принимают участие в регуляции коронарного кровообращения. Впоследствии образование гормонов сердца было подтверждено зарубежными учеными. Была описана функциональная система: нейросекреторный гипоталамус - эндокринное сердце.

В течение последних 25 лет академиком А.А. Галояном и его учениками были открыты ряд иммуномодуляторов, продуцируемых нейроэндокринными клетками гипоталамуса, расшифрован их химическая структура, осуществлен их синтез, в частности, иммуномодуляторы пептидного характера – пролином богатые полипептиды: галармин и его аналоги и до сих пор продолжаются работы с этими препаратами для клинических исследований в лечении ряда заболеваний. Спектр применения галармина очень широкий: болезни гематопоеза, нейродегенеративные, инфекционные и опухолевые заболевания.

Результаты многолетних научных исследований А. Галояна с сотрудниками отражены в 700 научных публикациях в ведущих отечественных и международных журналах, 32 патентах и четырех монографиях:

1. Галоян А.А. Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции. Ереван: Айастан, 1965. 236 с.
2. Galoyan A.A. Biochemistry novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system: neurosecretory hypothalamus – endocrine heart. Nauka Publ., Moscow, 1997. 240 p.
3. Galoyan A.A. Brain Neurosecretory cytokines: immune response and neuronal survival. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York, 2004. 188 p.
4. Galoyan A.A. Brain Immune System Signal Molecules in Protection from Aerobic and Anaerobic Infection (Series: Advances in Neurobiology, V. 6) // Springer, 2012, 198 p.

А.А. Галоян выступал также в качестве соредактора в издании "Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology (Neuroimmunology)", 3rd Edition, Springer, 2008, 500с.

Научные достижения А.А. Галояна получили международное признание. В 1999 г. вышел в свет специальный выпуск журнала "Neurochemical Research", посвященный А. Галояну, в котором со своими статьями выступили крупные ученые из различных стран (США, России, Канады, Армении, Италии, Дании, Венгрии, Финляндии).

Академик А.А. Галоян был награжден многими медалями, в числе которых диплом и медаль имени П.Эрлиха, медаль имени И.П. Павлова от Российского физиологического общества (2010, 2012), золотая медаль от Академии медицинских наук РА, медаль имени академика В.А. Амбарцумяна от Президента НАН РА, медаль «Анания Ширакаци», золотые медали от Государственного

---

университета им. М.Гераци и от Гюмрийского государственного педагогического университета. Правительство Армении наградило академика А.А. Галояна за выдающиеся достижения в развитии нейробиологических наук «Золотой медалью» Министерства науки и образования, а также присвоило ему звание «Заслуженного деятеля науки Армении».

В последний год жизни акад. Галоян был избран иностранным членом Академии Наук Российской Федерации и награжден медалью имени М.В.Ломоносова (2012).

Жизнь талантливого ученого оборвалась в октябре 2012 года в возрасте 83-х лет.

До последних дней своей жизни проф. Галоян оставался активным человеком, проявлял живой интерес к результатам исследований своих коллег, участвовал в научных конференциях, разрабатывал программы будущих научных работ. Столь интенсивная деятельность была бы невозможна без огромной энергии, увлеченности, преданности науке, исключительного оптимизма, таланта общения. А.А. Галоян не был человеком, способным почивать на лаврах.

А.А. Галояна будут с благодарностью вспоминать те, кому посчастливилось встречаться с ним или работать под его руководством. Едва ли можно вспомнить о какой-либо встрече с ним, которая не вызывала бы ощущения энергии и вдохновения, исходивших от этого человека. Он останется в светлой памяти членов его семьи, друзей, учеников и коллег.

Директор Института биохимии НАН РА,  
зав отделом биохимии нейрогормонов,  
доктор биологических наук

С.Г. ЧАИЛЯН

Старший научный сотрудник  
отдела биохимии нейрогормонов,  
кандидат биологических наук, доцент

Л.Н. АРАКЕЛЯН



**• Փորձարարական և  
տեսական հոդվածներ •**

**• Экспериментальные и  
теоретические статьи •**

**• Experimental and  
theoretical articles •**

---



Биолог. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

А.А.АНТОНЯН<sup>1</sup>, С.Г.ШАРОЯН<sup>1</sup>, А.А.АРОЯН<sup>2</sup>, Р.А.АРУТЮНЯН<sup>2</sup>,  
С.С.МАРДАНЯН<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

<sup>2</sup> Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци  
biochem@ipia.sci.am

При воспалительных заболеваниях суставов активность аденозиндезаминазы (АДА) в синовиальной жидкости (СЖ) больных достоверно выше, чем при невоспалительных поражениях суставов. Фермент понижает концентрацию аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами, способствуя усилению процесса. С целью выявления средств, ингибирующих активность фермента в СЖ, проведено *ex vivo* исследование влияния на активность АДА классического ингибитора EHNA, а также производных EHNA и аденозина. Кроме того, исследовано влияние на активность АДА этаноловых экстрактов 4-х видов растений и выделенных из них 6-ти фракций. Вычислены концентрации полумаксимального ингибирования исследованных препаратов IC<sub>50</sub>. Эффективность ингибирования АДА в СЖ исследованными синтезированными соединениями сравнима с ингибированием препаратов АДА, очищенных из различных биологических жидкостей человека. Достаточно низкий порядок величин IC 50 для ингибирования фермента в СЖ позволяет рассматривать исследованные растительные препараты перспективными противовоспалительными средствами. На основании результатов описанных *ex vivo* исследований можно предложить проведение клинических исследований синтетических и природных ингибиторов АДА в качестве лечебных средств при воспалительных артритах.

*Аденозиндезаминаза - воспалительный артрит - ингибирование фермента -  
растительные препараты - синовиальная жидкость.*

Յոդերի բորբոքային ախտահարումների ժամանակ հիվանդների սինովիալ հեղուկում (ՍՀ) ադենոզինդեամինազի (ԱԴԱ) ակտիվությունը հավաստիորեն ավելի բարձր է հոդերի ոչ-բորբոքային ախտահարումների նկատմամբ: Ֆերմենտը նվազեցնում է հակաբորբոքային ազդեցությամբ օժտված ադենոզինի կոնցենտրացիան և նպաստում բորբոքման խորացմանը: ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվությունը ընկճող միջոցներ ի հայտ բերելու նպատակով, *ex vivo* ուսումնասիրվել է ակտիվության վրա ֆերմենտի հայտնի արգելակիչ EHNA-ի, դրա և ադենոզինի ածանցյալների ազդեցությունը: Ուսումնասիրվել է նաև 4 բույսի էթանոլային թուրմերի և դրանցից անջատված 6 ֆրակցիաների ազդեցությունը ԱԴԱ-ի ակտիվության վրա: Հաշվարկվել են ուսումնասիրված նյութերով կիսամաքսիմալ ընկճման կոնցենտրացիաները, IC<sub>50</sub>: Սինթեզված միացություններով ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվության ընկճման էֆեկտիվությունը համեմատելի է մարդու տարբեր կենսաբանական հեղուկներից անջատված ֆերմենտի ընկճման հետ: Հետազոտված բուսական պատրաստուկներով ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվության ընկճման IC<sub>50</sub>-ի բավական ցածր արժեքները թույլ են տալիս դիտարկել դրանք որպես հեռակարային հակաբորբոքային միջոցներ:

Ակարագրված *ex vivo* հետազոտության արդյունքների հիման վրա կարելի է առաջարկել ԱԴԱ-ի սինթետիկ և բնական արգելաիչների կլինիկական փորձարկումը, որպես հակաբորբոքային միջոցներ:

*Ադենոզինդեամինազ - բորբոքային արթրիտ - սինովիալ հեղուկ - ֆերմենտի ակտիվության ընկճում - բուսական պատրաստուկներ - սինթետիկ արգելաիչներ*

Activity of adenosine deaminase (ADA) in synovial fluid (SF) of patients at inflammatory joint diseases is significantly higher than at non inflammatory diseases. The enzyme reduces the concentration of anti-inflammatory agent, adenosine, and contributes to the inflammation development. To reveal the natural inhibitors of ADA in SF, the action of its known inhibitor, EHNA, and two derivatives of adenosine and EHNA were studied *ex vivo*. The influence of ethanol extracts of 4 plants, used as food and in folk medicine, and of 6 their fractions were studied also. The half-maximal inhibition concentrations,  $IC_{50}$ , for all studied preparations were calculated. The efficiency of ADA inhibition in SF by synthesized compounds is comparable with inhibition of ADA purified from human different biological fluids. Rather low order of  $IC_{50}$  values for ADA inhibition in SF by studied plant preparations allow us to consider them as prospective anti-inflammatory remedy. Based on the obtained results we can offer the clinical testing of synthetic and natural inhibitors of ADA as anti-inflammatory agents.

*Adenosine deaminase - inflammatory arthritis- synovial liquid- inhibition coefficient; plant preparations- synthesized inhibitors*

Воспалительные заболевания суставов представляют собой гетерогенную группу нарушений, затрагивающих не только суставные ткани, но часто многие органы в организме. Они приводят к ранней потере трудоспособности, характеризуются высокой летальностью [5, 6]. 1-2 % населения мира страдает от этого заболевания. Его причины и факторы, приводящие к воспалительным процессам, пока не выяснены. Для лечения предлагаются нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикостероиды, и ряд противоревматических препаратов.

При метаболических стрессах и клеточных нарушениях в ишемических, гипоксических и воспаленных тканях во внеклеточной среде накапливается аденозин, играющий роль защитного агента [2, 7]. Аденозин участвует в снижении уровня провоспалительных и повышении уровня противовоспалительных цитокинов, регулировании воспалительной функции макрофагов, моноцитов и эндотелиальных клеток. Предполагается, что аденозин вовлечен в регуляцию воспалительных суставных заболеваний [3, 11].

Аденозиндезаминаза (АДА, К.Ф. 3.5.4.4) [4] ответственна за катаболизм аденозина. Она представлена практически во всех тканях человека [9]. Оказалось, что при воспалительных артритах активность АДА в синовиальной жидкости (СЖ) больных значительно выше, чем при невоспалительных поражениях суставов [8, 12]. Это способствует усилению развития воспаления, поскольку фермент снижает уровень противовоспалительного агента аденозина. Поэтому ингибирование АДА может явиться терапевтическим подходом для смягчения воспалительного процесса.

Данная работа направлена на выявление средств ингибирования АДА в СЖ. Было исследовано влияние производных субстрата фермента, аденозина, а также его классического ингибитора EHNA и его производных. Исследовано также влияние на активность АДА этаноловых экстрактов 4-х видов растений и выделенных из них 6-ти фракций.

### Материал и методика.

Аденозин и EHNA приобретены в фирме Сигма, США. Их производные были синтезированы в Университете Камерино, Италия.

Синовиальные жидкости брали в Ереванском медицинском центре “Эребуни”. Образцы хранили при -20°C. Перед исследованием их размораживали и центрифугировали.

Экстракты растений и их фракции получали как описано нами ранее [1].

Активность АДА оценивали по количеству аммиака, выделенного в реакции дезаминирования аденозина, используя фенолгипохлоритный колориметрический метод, описанный нами ранее [10]. Активность выражали в международных единицах IU.

При исследовании влияния на активность фермента синтезированных препаратов в инкубационную смесь добавляли аликвоту исходного водного раствора препарата до определенной концентрации. При исследовании влияния растительных препаратов, исходные растворы высушенных препаратов готовили в 70 %-ном этаноле. При этом концентрация этанола в инкубационной смеси не превышала 2 %, и не влияла на активность АДА. Для определения концентрации полумаксимального ингибирования АДА (IC<sub>50</sub>) исследуемыми препаратами, определяли активность фермента при разных концентрациях препарата, и из концентрационных зависимостей вычисляли IC<sub>50</sub>, используя компьютерную программу GraFit Version 5 (Leatherbarrow, 2001, Erithacus Software Ltd., Horley, UK)

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

### Результаты и обсуждение.

В качестве ингибитора АДА в синовиальной жидкости было целесообразно в первую очередь исследовать производные субстрата фермента, 1-деза аденозин (1d-Ado) и 3-деза аденозин (3d-Ado).

На рис.1 представлена зависимость активности АДА и его ингибирования от концентрации 1d-Ado. Из литературы известно, что это соединение ингибирует выделенный и очищенный из животных тканей АДА по конкурентному механизму [10]. В наших опытах эффективность его ингибирования достигала максимума при концентрации 4 мкг/мл. 3d-Ado слабее ингибировал АДА в СЖ, как и в случае очищенного фермента [12].

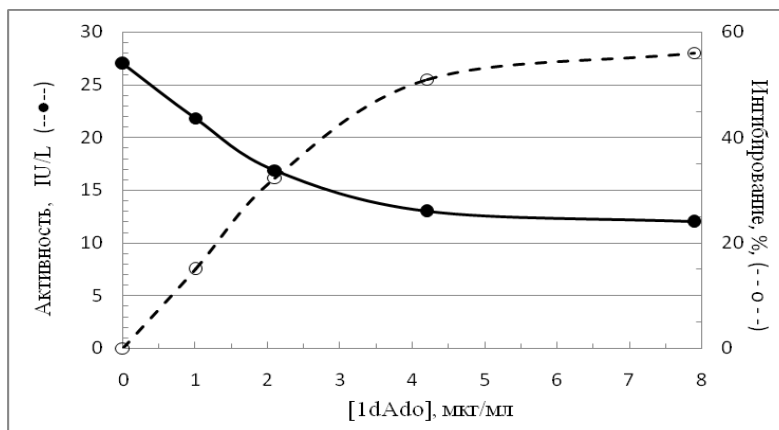


Рис.1. Зависимость активности АДА от концентрации 1d-Ado.

Исследовали также влияние на активность АДА в СЖ классического ингибитора фермента эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил) аденина (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine, EHNA) и двух его производных, 1-деза EHNA (1d-EHNA) и 3-деза EHNA (3d-EHNA).



На рис. 2 представлена зависимость активности АДА и его ингибирования от концентрации EHNA. В наших опытах ингибирование приближается к максимуму при концентрации EHNA 60 нг/мл. Отметим, что ингибирующая эффективность 3d-EHNA для АДА в СЖ, так же как и в случае очищенного АДА, близка к эффективности EHNA, в то время как эффективность 1d-EHNA значительно слабее [10].

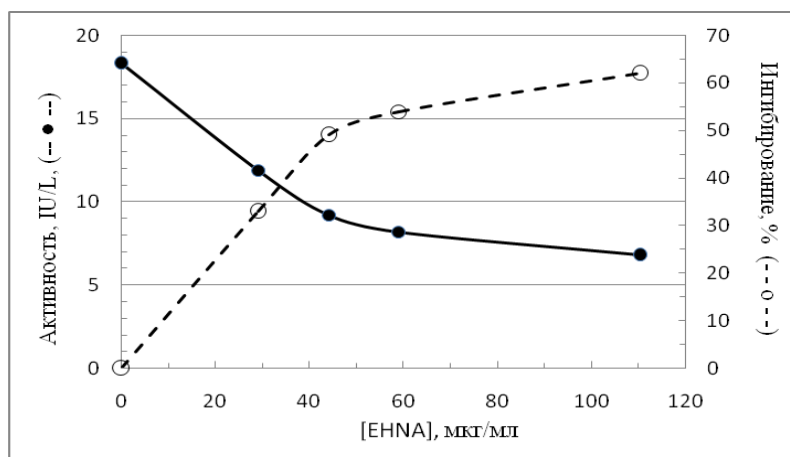


Рис.2 Зависимость активности АДА от концентрации EHNA.

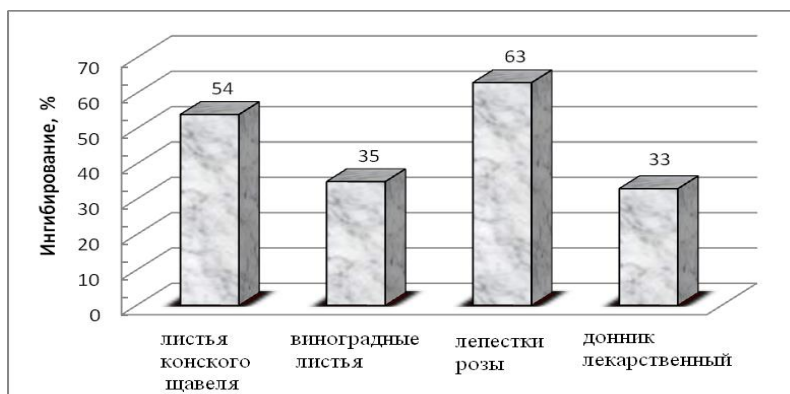
Были исследованы концентрационные зависимости ингибирования фермента в СЖ для всех указанных синтезированных соединений. Из этих зависимостей были определены  $IC_{50}$ . Результаты представлены в табл. 1, в которой для сравнения приведены величины  $IC_{50}$  для ингибирования АДА, выделенной из плевральной жидкости и плазмы крови человека [10].

Таблица 1. Значения  $IC_{50}$  для ингибирования активности АДА синтезированными соединениями

| Соединение | $IC_{50}$ , мкг/мл    |                           |                   |
|------------|-----------------------|---------------------------|-------------------|
|            | Синовиальная жидкость | Плевральная жидкость [12] | Плазма крови [12] |
| 1dAdo      | $5,04 \pm 0,64$       | 4,43                      | 6,54              |
| 3dAdo      | $964 \pm 110$         | > 2000                    | 1180              |
| EHNA       | $0,05 \pm 0,004$      | 0,074                     | 0,19              |
| 1dEHNA     | $0,533 \pm 0,09$      | 1,88                      | 1,11              |
| 3dEHNA     | $0,056 \pm 0,01$      | 0,088                     | 0,113             |

Приведенные в таблице данные свидетельствуют о том, что результаты наших исследований хорошо согласуются с эффективностью ингибирования АДА из других биологических жидкостей человека.

В следующей серии экспериментов было исследовано ингибирование активности АДА в СЖ этанольными экстрактами листьев конского щавеля, виноградных листьев, лепестков розы и надземной части донника лекарственного. На рис. 3 представлено ингибирование (в процентах от исходной активности фермента) исследованными экстрактами в концентрации 0,5 мг/мл.



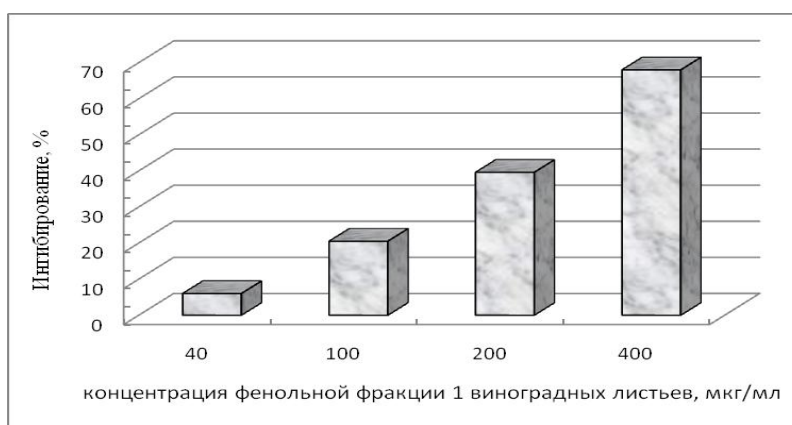
**Рис. 3.** Ингибирование активности АДА в СЖ экстрактами листьев конского щавеля, виноградных листьев, лепестков розы и донника лекарственного в концентрации 0,5 мг/мл.

Из концентрационных зависимостей ингибирования вычислены  $IC_{50}$  для этих экстрактов (табл. 2). Данные табл. 2 подтверждают результаты, представленные на рис. 3: в ингибировании АДА наиболее эффективен экстракт лепестков розы, затем – листьев конского щавеля.

**Таблица 2.** Величины  $IC_{50}$  для ингибирования АДА экстрактами растений

| Растение               | $IC_{50}$ , мг/мл |
|------------------------|-------------------|
| листья конского щавеля | $0,42 \pm 0,01$   |
| виноградные листья     | $0,65 \pm 0,11$   |
| лепестки розы          | $0,22 \pm 0,02$   |
| донник лекарственный   | $0,71 \pm 0,1$    |

В следующей серии экспериментов исследовано ингибирование активности АДА в СЖ выделенными из этанольных экстрактов фракциями, обогащенными определенными биологически активными соединениями [1]. Исследованы зависимости ингибирования фермента от концентрации фракций, проявивших значительную эффективность.



**Рис. 4.** Ингибирование АДА в СЖ при разных концентрациях фенольной фракции1 из виноградных листьев.

На рис. 4 представлено ингибирование АДА в СЖ при разных концентрациях фенольной фракции<sup>1</sup> из экстракта виноградных листьев. Из концентрационных зависимостей вычислены  $IC_{50}$  для трех фракций из экстракта листьев конского щавеля, двух фракций из виноградных листьев, и одной фракции из лепестков розы.

В табл. 3 представлены полученные результаты, согласно которым ингибирование активности фермента растительными препаратами обусловлено, в основном, фенольными компонентами. В случае конского щавеля значительный вклад имеют также содержащиеся в нем антраценовые производные.

**Таблица 3.**  $IC_{50}$  ингибирования АДА в СЖ фракциями из растительных экстрактов.

| Растение               | Фракция                  | $IC_{50}$ , мкг/мл |
|------------------------|--------------------------|--------------------|
| Листья конского щавеля | кумариновая              | $1700 \pm 190$     |
|                        | фенольная                | $8,1 \pm 0,5$      |
|                        | антраценовые производные | $36,3 \pm 0,44$    |
| Виноградные листья     | фенольная, 1             | $240 \pm 17$       |
|                        | фенольная, 2             | $160 \pm 22$       |
| Лепестки розы          | фенольная                | $128 \pm 27$       |

В данной работе показано, что в ингибировании активности АДА в СЖ из двух производных аденозина наиболее эффективен 1d-Ado. Из соединений семейства EHNA EHNA и 3d-EHNA близки по эффективности, а 1d-EHNA уступает им на порядок. Интересно, что ингибирующая эффективность фенольной фракции конского щавеля сравнима с эффективностью синтезированного ингибитора 1dAdo.

Результаты описанных исследований свидетельствуют о том, что экстракты используемых в пищу и в народной медицине растений и их компоненты проявляют способность ингибировать АДА, и следовательно могут рассматриваться перспективными противовоспалительными средствами.

На основании проведенных *ex vivo* исследований можно предложить тестирование синтетических и природных ингибиторов АДА в качестве противовоспалительных средств.

#### **Список сокращений**

1d-Ado – 1-деза аденозин; 3d-Ado – 3-деза аденозин; 1d-EHNA – 1-деза EHNA; 3d-EHNA – 3-деза EHNA; EHNA – эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)аденин (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine);  $IC_{50}$  – концентрация полумаксимального ингибирования.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Antonyan A., Sharoyan S., Harutyunyan H. ., Movsisyan N, Sargisova Y. , Stepanyan H., Mardanyan S. Cytotoxicity of Some Edible Plants toward Ehrlich Ascites Carcinoma Cells; Research J. of Medicinal Plant, 8, 20-31, 2014.
2. Chan E. S. L., Fernandez P., Cronstein B. N. Adenosine in inflammatory joint diseases. Purinergic Signalling, 3, 145–152, 2007.

3. *Cohen S.B., Gill S.S., Baer G.S., Leo B.M., Scheld W.M., Diduch D.R.* Reduction joint destruction due to septic arthrosis using an adenosine A2A receptor agonist. *J Orthop Res.* 22, 427–35, 2004.
4. *Daddona P.E.* Human adenosine deaminase. *J Biol Chem.*, 256, 12496-12501, 1981.
5. *Majithia V., Geraci S.A.* Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am. J. Med.*, 120 (11), 936 – 939, 2007.
6. *Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S.* Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*; 1, 102–10, 2005.
7. *Nemeth Z.H., Bleich D., Csoka B., et al.* Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *FASEB J.* 21, 2379–88, 2007.
8. *Pettersson T., Klockars M., Weber T.H., von Essen R.* Adenosine deaminase activity in joint effusions. *Scand J Rheumatol* 17, 365–9, 1988.
9. *Ratech H., Martiniuk F., Borer W.Z., Rappaport H.* Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. *Blood*, 72, 1627–32, 1988.
10. *Sharoyan S., Antonyan A., Mardanyan S., Lupidi G., Cristalli G.* Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *Acta Biochimica Polonica*, 53, 539–543, 2006.
11. *Tesch A.M., MacDonald M.H., Kollias-Baker C., Benton H.P.* Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *OAC*, 12, 349–59, 2004.
12. *Zakeri Z., Izadi Sh. Niazi A., Bari Z., Zendeboodi S., Shakiba M., Mashhadi M., Narouie B., Ghasemi-Rad M.* Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med.*, 5(2), 195-200, 2012.

#### **Благодарность**

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Армения, код #1-21.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, Հավելված 1 (66), 2014

## ԻՄՈՒՆԱՏՐՈՊ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԴԵՊՋՈՒՄ // ԴՆԵԳԵԱՏՈՐԱՅԻՆ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ԶԱՆԱԿԱԿԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՀԱՄԱՀԱՐԱՐԵՐԱԿՑԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆ

Ա.Ս. ԲԱԴԱԼՅԱՆ, Խ.Վ. ԲԱԴԱԼՅԱՆ, Ս.Գ. ԶԱԽԼՅԱՆ

ՀՀ ԳԱՄ Հ. Բուկիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ  
asya.badalyan@mail.ru

Ուսումնասիրվել է // ԴՆԵԳԵԱՏՈՐԱՅԻՆ ԲԶԻԶՆԵՐԻ քանակական ցուցանիշների համահարաբերակցական կապը իմունամոդուլյատորների ազդեցությամբ: Ցույց է տրվել, որ իմունատրոպ պատրաստուկների ընդունումը ուղեկցվում է արյան //ԴՆԵԳԵԱՏՈՐԱՅԻՆ ԲԶԻԶՆԵՐԻ և ավշային բջիջների միջև, ինչպես նաև լիմֆոցիտների ու ֆոնոցիտների քանակական պարունակության միջև ֆունկցիոնալ կապերի առաջացումով:

*Գալարմին - լիմֆոցիտներ - ֆագոցիտային ակտիվություն*

Исследована корреляционная взаимосвязь показателей *ILT*-рецепторных клеток под воздействием препаратов, используемых в качестве иммуномодуляторов. Показано, что применение иммуностропных препаратов сопровождается образованием функциональных связей между степенью розеткообразующей активности *ILT*-рецепторных клеток крови и лимфатических узлов и количественным содержанием лимфоцитов и розеткообразующих тимоцитов.

*Галармин - лимфоциты - фагоцитарная активность*

Investigated the correlation relationship indicators *ILT*-receptor cells under the influence of preparations, used as the immunomodulators. It is shown that the use of immune preparations accompanied by the formation of functional connections between the degree of activity of *ILT*- receptor cells of blood and lymph nodes and quantitative content of lymphocytes and thymocytes.

*Galarmin - lymphocytes - phagocytic activity*

Օրգանիզմի իմուն պատասխանի հիմքում ընկած է 3 հիմնական բջիջների խմբերի համագործակցությունը: Դրանք T, B լիմֆոցիտներն ու մակրոֆագերն են, որոնց մասնակցության բաժինը իմուն պատասխանում կախված է ինֆեկցիայի տեսակից [1, 3]: Դրանց գործունեության սկզբունքը հիմնված է այն ռեցեպտորների գոյության վրա, որոնք կարող են կապվել բջջի հետ կամ արտազատվել հակամարմինների տեսքով [2]: Գործնականում իմուն համակարգի վիճակի գնահատականը հիմնված է հակամարմինների և իմունակոմպետենտ բջիջների քանակական բնութագրի վրա և հանդիսանում է օգտագործվող իմունակարգավորիչ պատրաստուկների անվտանգության և արդյունավետության հիմնական ստուգիչ:

Հայտնի է, որ իմունատրոպ պատրաստուկները լայնորեն օգտագործվում են երկրորդային իմունային անբավարարությունը կանխարգելման համար [4]:

Իմունաձևության գործընթացում իմունակումպետենտ բջիջների ֆունկցիոնալ և ռեցեպտորային հատկությունների ուսումնասիրման նպատակով, որպես իմունամոդուլյատորներ, նատրիումի նուկլեինատի, գալարմինի և սելենոպիրանի ազդեցությամբ որոշվել է IL T (իմունազլոբուլինանման մոլեկուլներ)-ռեցեպտորային բջիջների քանակական ցուցանիշների համահարաբերակցական կապը [5, 6]:

#### Նյութ և մեթոդ:

Յետագոտության նյութ են հանդիսացել մկների առաջնային (թիմուս) և երկրորդային (ավշային հանգույցներ) ավշային օրգանները, արյունը և ներորոգայնային մակրոֆագերը:

Փորձարարական աշխատանքների կատարման համար օգտագործվել են 20 հատ 18-20գ մարմնի միջին զանգվածով ոչ գծային արու սպիտակ մկներ: Կենդանիները բաժանվել են չորս խմբի (յուրաքանչյուրում 5-ական կենդանի), որոնց ե/մ եղանակով ներարկվել են համապատասխանաբար 0.2-ական մլ նատրիումի նուկլեինատ, գալարմին, սելենոպիրան և ֆիզիոլոգիական լուծույթ: Իմունազլոգիական ցուցանիշներն ուսումնասիրվել են պրեպարատների ներարկումից 24 ժ հետո:

Յետագոտության արդյունքները ենթարկվել են վիճակագրական վերլուծության: Վարիացիոն շարքի բաշխման նորմալությունը ստուգվել է Կոլմոգորով-Սմիրնովի թեստով, որից հետո զույգ առ զույգ համեմատությունների ժամանակ օգտագործվել է Ստյուդենտի թեստը անկախ ընտրանքի համար: Արդյունքների համեմատական վերլուծությունը կատարվել է՝ օգտագործելով ANOVA տվյալների պարամետրիկ միագործոն վերլուծությունը: Արդյունքները համարվում են հավաստի առաջին տիպի սխալի հավանականությամբ ( $p < 0.05$ ): Վիճակագրական հաշվարկները կատարվել է SPSS 16 համակարգչային ծրագրով:

#### Արդյունքներ և քննարկում:

Փորձի արդյունքներից պարզվել է, որ տարբեր իմունատրոպների ներարկումից հետագոտվող իմունազլոգիական ցուցանիշների միջև կապվածության աստիճանը տարբեր է (նկ. 1):

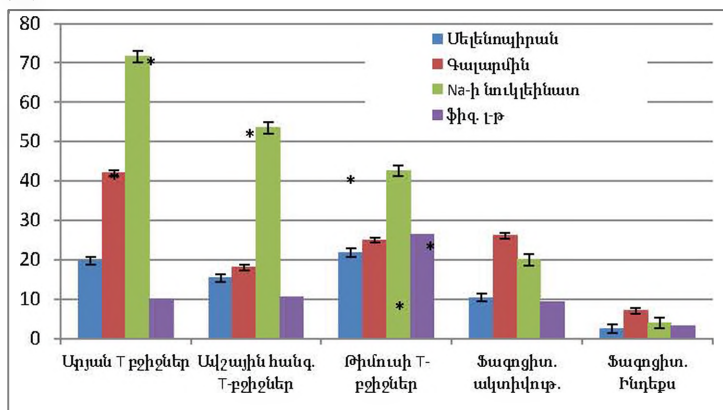
Ու չնայած այդ տարբերությանը՝ բոլոր խմբերում մշտապես պահպանվում է ավշային հանգույցների և արյան T բջիջների ցուցանիշների ուղիղ կոռելյացիոն կապ: Յետևաբար այդ պատրաստուկների ֆոնի վրա ներքջային համագործակցությունները բնութագրելու և իմունազլոգիական ցուցանիշների համահարաբերակցական կապը գնահատելու համար որոշվել է կոռելյացիոն գործոնը այդ ցուցանիշների միջև (աղ. 1):

**Աղյուսակ 1.** Իմունատրոպների ազդեցությամբ իմունազլոգիական ցուցանիշների համահարաբերակցական կապը

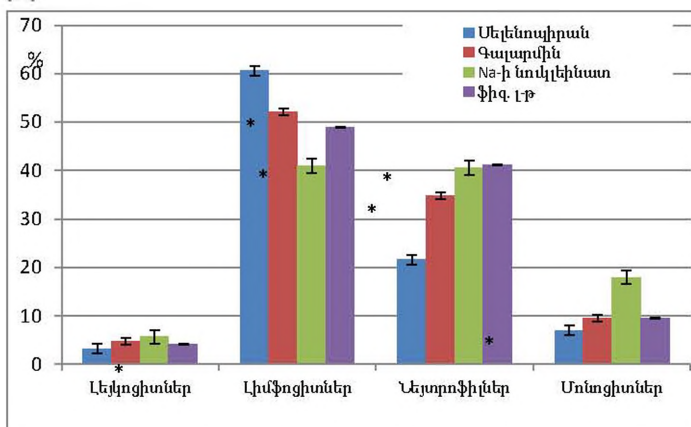
| Համահարաբերակցական կապ                         | Կորելացիոն գործակից |
|------------------------------------------------|---------------------|
| Արյան T բջիջներ-ավշային հանգույցների T-բջիջներ | $r=0.93$            |
| Թիմուսի T-բջիջներ -լիմֆոցիտներ                 | $r=0.95$            |
| Լիմֆոցիտ-նեյտրոֆիլ                             | $r=-0.96$           |
| Լեյկոցիտների բացարձակ արժեք-մոնոցիտներ         | $r=-0.82$           |
| Թիմուսի T բջիջներ-նեյտրոֆիլներ                 | $r=-0.90$           |
| Արյան T-բջիջներ-մոնոցիտներ                     | $r=-0.94$           |

Բոլոր խմբերում մշտապես պահպանվել է ուղիղ կոռելյացիա արյան և ավշային հանգույցների T-լիմֆոցիտների ( $r=0.93$ ), թիմուսի T-բջիջների և լիմֆոցիտների պարունակության միջև: Միաժամանակ նկատվել է ուժեղ հետադարձ կոռելյացիոն փոխկապակցվածություն նեյտրոֆիլների և լիմֆոցիտների պարունակության, լեյկոցիտների բացարձակ թվի և մոնոցիտների միջև ( $r=-0.86$ ), թիմոցիտների մակարդակի ու նեյտրոֆիլների պարունակության միջև ( $r=-0.9$ ), մոնոցիտների պարունակության և պերիֆերիկ արյան T-բջիջների մակարդակի միջև:

(Ա)



(Բ)



Ծանոթություն՝  $p < 0,05$  \* -ստուգելի նկատմամբ,  $n=5$

Նկ. 1. Իմունատրոպների ազդեցությամբ բջջային իմունիտետի որոշ ցուցանիշներ

Այսպիսով, կարելի է համարել, որ իմունատրոպ պատրաստուկների ընդունումը ուղեկցվում է թիմոցիտների ու լիմֆոցիտների քանակական պարունակության, ավշային հանգույցների ու արյան // Դ-ռեցեպտորային բջջերի ակտիվության աստիճանի միջև փոսկցիոնալ կապի առաջացմամբ:

- Դրական կորելացիա ավշային հանգույցների և պերիֆերիկ արյան բջջերի ակտիվության միջև ( $> 0,7$ ):
- Դրական կորելացիա թիմոցիտների և լիմֆոցիտների հարաբերական պարունակության միջև:
- Բացասական կորելացիա թիմուսի T-բջջերի և նեյտրոֆիլների քանակական ցուցանիշների միջև ( $> -0,7$ ):

### ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований// М. «Медицина», 546 с, 2006.
2. Тоголян А. А., Фрейдлин И. С. Клетки иммунной системы. С.-ПБ., Наука, 1, 131, 2000.
3. Федоров Ю.Н. Верховский О.А., Жаданов А.И., Ездакова И.Ю. Кинетика синтеза различных типов антителосекретирующих клеток костного мозга мышей в процессе иммуногенеза // Доклады РАСХН, 5, С. 42-44, 2000.
4. Ярилин А. А. Контактные межклеточные взаимодействия при иммунном ответе. Мед. Иммунол., I(1-2): 37-45, 1999.
5. Galoyan A. A. Biochemical and molecular biological aspects of the brain immune system.-M.: «Nauka» publishers, -P.308. 2001.
6. Galoyan, A. Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: signal molecules / A. Galoyan // J. Neurochem. Res. - 9-10 (25). - P. 13431355. 2000.





Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## УРОВЕНЬ МЕМБРАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ САРКОМЕ-45 И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЦИАНОСОДЕРЖАЩИХ ЛАКТОНОВ

Г.М. ГАЛОЯН<sup>2</sup>, П.А. КАЗАРЯН<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Гематологический центр МЗ РА, 375014

<sup>2</sup> Ереванский государственный университет

E-mail: gayanegaloyan@rambler.ru

Изучались метаболизм фосфолипидов (ФЛ) и содержание продуктов перекисного окисления липидов при саркоме-45 в эритроцитах и гепатоцитах, а также при введении нового производного цианосодержащих ненасыщенных лактонов. Обнаружен корректирующий эффект указанного соединения, что проявляется уменьшением количества продуктов свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) и стабилизацией липидных компонентов мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45.

*Саркома-45- новое производное цианосодержащих лактонов- фосфолипиды- перекисное окисление липидов*

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆոլիպիդների (ՖЛ) փոխանակությունը - լիպիդային գերօքսիդացման արգասիքների քանակը երիթրոցիտներում - հեպատոցիտներում սարկոմա-45-ի ժամանակ - ցիան խումբ պարունակող չհագեցած լակտոնների նոր ածանցյալի ներարկումից հետո: Նկատվել է նշված լակտոնի կարգավորող ազդեցությունը, որը դրսևորվում է երիթրոցիտներում - հեպատոցիտներում գերօքսիդացման արգասիքների նվազեցմամբ - թաղանթների լիպիդային բաղադրամասերի կայունացմամբ սարկոմա - 45-ի ժամանակ:

*Սարկոմա-45- ցիան խումբ պարունակող չհագեցած լակտոնների նոր ածանցյալ- ֆոսֆոլիպիդներ-լիպիդների գերօքսիդացում*

The content of phospholipids (PL) metabolism and lipid peroxidation products in erythrocytes and hepatocytes membranes during the sarcoma-45 and influence of new derivative of cyan containing unsaturated lactones was studied. This study revealed, that lactone have normalizing effect. It is displayed by decreasing of free radicals oxidation level and stabilization of erythrocytes and hepatocytes membranes lipid structures during sarcoma-45.

*Sarcoma-45 - new derivative of cyanide lactone – phospholipides - lipid peroxidation*

Согласно литературным данным [8], в структуре смертности от злокачественных новообразований более 30% занимают лица в возрасте моложе 60 лет, поэтому большое значение приобретает высокая социальная значимость ранней диагностики, профилактики и лечения онкологических заболеваний.

Результаты [8] исследований свидетельствуют о возрастании распространенности онкологических заболеваний во всем мире, в том числе и в РА.

Характерная особенность развития патологических процессов в организме человека - это существование так называемых порочных кругов, то есть ситуаций, когда одно нарушение влечет за собой другое, которое в свою очередь усиливает первое и т.д. С такой же ситуацией мы сталкиваемся в случае злокачественного роста [2]. Нашими предыдущими исследованиями [10] было доказано, что при саркоме-45 развивается дефицит аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит к разрушению работы насосов, выкачивающих из клетки ионы кальция и натрия [4]. Последнее в свою очередь приводит к активации мембранных фосфолипаз [5].

По данным современной медицины и молекулярной биологии, в механизмах патогенеза многих заболеваний, в том числе и злокачественных новообразований, ведущую роль играют изменения структуры и функции биологических мембран, в частности фосфолипидных компонентов биомембран [7, 14]. Относительно стабильное содержание фосфолипидов (ФЛ) биомембран обеспечивает ее основные регуляторные функции: осуществление процессов окислительного фосфорилирования, свертывания крови, преобразование энергии, трансмембранный перенос веществ, коммуникационную связь клетки с окружением [9, 12].

В связи с вышеизложенным проблема поиска новых потенциально активных фармакологических веществ, обладающих антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, является вполне актуальной.

Цель настоящего исследования – изучение влияния нового производного цианосодержащих лактонов (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид), синтезированного в Ереванском гос.университете, на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) и обмена ФЛ при саркоме-45 в мембранах гепатоцитов и эритроцитов крови.

#### **Материал и методика.**

Эксперименты проводились на 37 белых крысах-самцах линии Вистар массой 140-160г, разделенных на три группы. Первая контрольная группа состояла из 15 интактных животных. Животным второй и третьей групп (по 11 крыс в каждой) подкожно перевивали штамм саркомы-45 [11]. Перевивку проводили в стерильных условиях в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии ИТОХ НАН РА. Штамм саркомы-45 был получен из опухолевого банка Онкологического научного центра МЗ РФ (Москва). Начиная с 5-го дня перевивки, после регистрации роста опухоли, животные взвешивались и близкие по массе тела и размерам опухоли разделялись на две группы. Затем подопытным животным третьей группы ежедневно в течение 8 сут вводили 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид (в виде крахмального раствора) в дозе 17,5 мг/кг. Это цианосодержащий ненасыщенный лактон, многие представители которого обладают противоопухолевой активностью [1]. Животных забивали на 15 сут эксперимента методом декапитации, исследуемые органы изолировались в условиях холода (0-4° С). Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом тонкослойной хроматографии в модификации Казаряна П.А. [6, 13] на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мк (Чехия). Для разделения ФЛ использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Липидный фосфор фотометрировали при 815 нм [6]. Об активности ПОЛ судили по количеству конечных молекулярных продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид). В пробах МДА определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [3].

Оптические спектральные измерения проводили на спектрофотометре "Specord M-40" (Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности.

**Результаты и обсуждение.**

Изучением спектра ФЛ в мембранах эритроцитов крови и гепатоцитов при саркоме-45 установлены определенные закономерности. При этом наблюдается увеличение содержания цитотоксичных лизофосфатидилхолинов (ЛФХ).

Известно, что существует несколько путей метаболизма ЛФХ, нарушение которых может привести к накоплению фосфатидов-глицеридов. Первой ферментативной реакцией является гидролиз фосфатидилхолинов (ФХ) при участии фосфолипаз  $A_1$  и  $A_2$ , увеличение активности которых может привести к накоплению ЛФХ.

При опухолевых заболеваниях в условиях недостаточности АТФ нарушается активность Na, K-АТФ-аз, в результате чего в клетках накапливаются ионы  $Ca^{2+}$ , которые являются активаторами фосфолипаз. Второй причиной накопления ЛФХ в тканях при опухолевых заболеваниях является ингибирование активности лизофосфолипазы, участвующей в превращении ЛФХ в глицерофосфохолин и жирную кислоту.

Заслуживает внимания почти двукратное уменьшение содержания дифосфатидилглицеридов (ДФГ) при саркоме-45 в мембранах эритроцитов крови (табл.1). Известно, что АТФ-АДФ-синтетаза находится в окружении ДФГ. Было установлено, что каждая молекула АТФ-АДФ-синтетазы образует комплекс с шестью молекулами ДФГ [15], и нарушение липидного окружения фермента может привести к изменению его активности. Интересно, что в гепатоцитах, наоборот, содержание ДФГ резко повышается (более 4 раз) (табл.2).

**Таблица 1.** Изменение относительного содержания индивидуальных ФЛ (ЛФХ, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭ, ФС, ФК и ДФГ) в мембранах эритроцитов (в % от суммы) белых крыс при саркоме-45 и после применения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида

| ФЛ  | Контроль<br>n=15 | Саркома-45<br>n=11            | После применения лактона<br>n=11            |
|-----|------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| ЛФХ | 4,3 ± 0,4        | 14,65 ± 0,85<br>$P_1 < 0,001$ | 6,03 ± 0,4<br>$P_2 < 0,001$ ; $P_3 < 0,05$  |
| ФИ  | 5,8 ± 0,43       | 12,22 ± 0,74<br>$P_1 < 0,001$ | 5,76 ± 0,13<br>$P_2 < 0,05$ ; $P_3 > 0,5$   |
| СФМ | 11,2 ± 0,81      | 5,39 ± 0,43<br>$P_1 < 0,001$  | 13,4 ± 0,9<br>$P_2 < 0,05$ ; $P_3 > 0,5$    |
| ФХ  | 44,1 ± 2,20      | 18,18 ± 0,8<br>$P_1 < 0,001$  | 31,76 ± 1,78<br>$P_2 < 0,01$ ; $P_3 < 0,05$ |
| ФЭ  | 16,8 ± 1,03      | 12,40 ± 0,7<br>$P_1 < 0,01$   | 25,23 ± 0,9<br>$P_2 < 0,01$ ; $P_3 < 0,05$  |
| ФС  | 8,2 ± 0,5        | 16,64 ± 0,9<br>$P_1 < 0,001$  | 6,45 ± 0,44<br>$P_2 < 0,01$ ; $P_3 < 0,05$  |
| ФК  | 2,5 ± 0,18       | 16,72 ± 0,7<br>$P_1 < 0,001$  | 2,38 ± 0,2<br>$P_2 < 0,001$ ; $P_3 > 0,5$   |
| ДФГ | 7,2 ± 0,6        | 3,77 ± 0,24<br>$P_1 < 0,01$   | 7,07 ± 0,3<br>$P_2 < 0,05$ ; $P_3 > 0,5$    |

**Примечание:**

$P_1$  – достоверность данных при саркоме-45 по сравнению с контролем

$P_2$  – достоверность данных после применения препарата по сравнению с данными саркомы-45

$P_3$  – достоверность данных после применения препарата по сравнению с контролем

Выявлено, что при саркоме-45 и в эритроцитах (табл.1), и в гепатоцитах (табл.2) уменьшается содержание фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ). Известно, что существует взаимосвязь между указанными фосфолипидами и Са-насосом. Установлено, что активность Са-насоса может регулироваться процессом метилирования ФЭ, приводящим к образованию ФХ [15]. С изменением состава мембранных фосфолипидов неразрывно связана также активность ПОЛ.

По нашим данным, саркома-45, как многие другие заболевания, в том числе и опухолевые, сопровождаются активированием процесса ПОЛ, что выражается в увеличении содержания МДА.

**Таблица 2.** Изменение относительного содержания индивидуальных ФЛ (ЛФХ, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭ, ФС, ФК иДФГ) в мембранах гепатоцитов (в % от суммы) белых крыс при саркоме-45 и после применения 2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида

| ФЛ  | Контроль<br>n=15 | Саркома-45<br>n=11                | После применения лактона<br>n=11              |
|-----|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
| ЛФХ | $2,35 \pm 0,39$  | $13,13 \pm 0,84$<br>$P_1 < 0,001$ | $4,48 \pm 0,53$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$   |
| ФИ  | $5,75 \pm 0,41$  | $13,37 \pm 0,86$<br>$P_1 < 0,001$ | $9,88 \pm 0,73$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$   |
| СФМ | $9,7 \pm 0,64$   | $7,23 \pm 0,5$<br>$P_1 < 0,05$    | $13,23 \pm 0,76$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$  |
| ФХ  | $46,3 \pm 2,03$  | $15,99 \pm 0,9$<br>$P_1 < 0,001$  | $29,01 \pm 1,7$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$   |
| ФЭ  | $24,2 \pm 0,69$  | $12,84 \pm 0,7$<br>$P_1 < 0,01$   | $18,04 \pm 1,4$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$   |
| ФС  | $6,35 \pm 0,49$  | $4,69 \pm 0,55$<br>$P_1 < 0,02$   | $14,37 \pm 0,93$<br>$P_2 < 0,001; P_3 < 0,01$ |
| ФК  | $1,8 \pm 0,19$   | $14,25 \pm 1,11$<br>$P_1 < 0,001$ | $3,56 \pm 0,24$<br>$P_2 < 0,001; P_3 < 0,05$  |
| ДФГ | $3,55 \pm 0,62$  | $14,54 \pm 0,95$<br>$P_1 < 0,001$ | $6,52 \pm 0,48$<br>$P_2 < 0,01; P_3 < 0,05$   |

**Примечание:**

$P_1$  – достоверность данных при саркоме-45 по сравнению с контролем

$P_2$  – достоверность данных после применения препарата по сравнению с данными саркомы-45

$P_3$  – достоверность данных после применения препарата по сравнению с контролем

После применения исследуемого препарата статистически достоверно уменьшается содержание продуктов ПОЛ как в эритроцитах, так и в гепатоцитах (рис. 1 и 2).

Усл.ед.

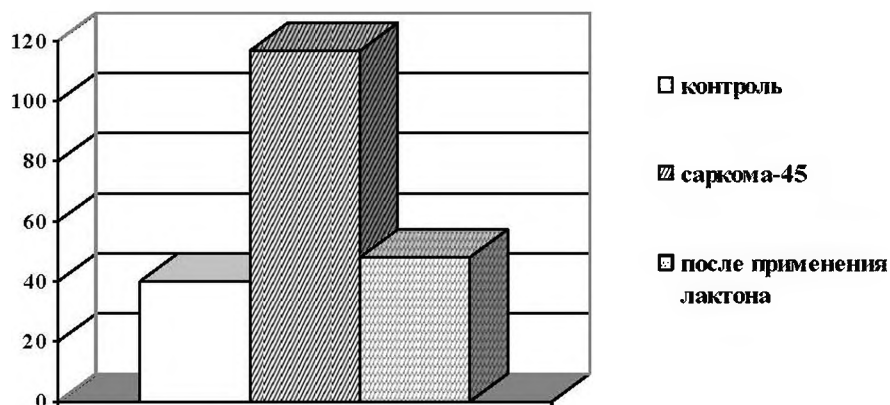


Рис. 1. Активность ПОЛ (усл. ед.) в мембранах эритроцитов при саркоме-45 и после применения лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-олид)

Усл.ед

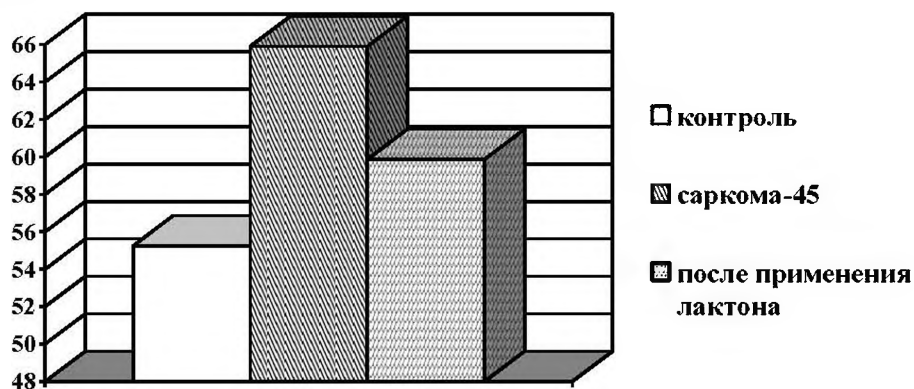


Рис. 2. Активность ПОЛ (усл. ед.) в гепатоцитах при саркоме-45 и после применения лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-олид)

Согласно нашим исследованиям, изученный препарат оказывает антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффекты.

Таким образом, выраженный корригирующий эффект циансодержащего лактона на метаболизм ФЛ и ПОЛ в гепатоцитах и эритроцитах крови указывает на необходимость его дальнейшего целенаправленного исследования при данной патологии.

### Список сокращений

Лизофосфатидилхолин - ЛФХ; дифосфатидилглицерид - ДФГ; фосфатидилхолин - ФХ; фосфатидилэтаноламины - ФЭ; фосфатидилинозит - ФИ; сфингомиелин - СФМ; фосфатидилсерин - ФС; фосфатидная кислота - ФК.

Г.М. ГАЛОЯН, П.А. КАЗАРЯН

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г.* Биологически активные производные 2-бутен- и 3-бутен-4-олидов. Хим. ж. Армении, 46(3-4), 219-236, 1993.
2. *Владимиров Ю.А.* Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки, Соросовский образовательный журнал, 6(9), стр.2-9, 2000.
3. *Зубер В.Л.* Методы биохимических исследований, изд-во ЛГУ, стр.74-87. Л., 1982.
4. *Казарян П.А., Галоян Г.М.* Изучение транспортных АТФазных систем плазматических мембран эритроцитов и гепатоцитов при саркоме-45 и после применения нового производного цианосодержащих лактонов // Доклады Академии наук Армении, 114 (1), стр.58-63, 2014.
5. *Казарян П.А., Галоян Г.М., Аветисян А.А., Казарян А.П., Мурадян Р.Е.* Регуляция процессов распада фосфатидов-глицеридов под действием ненасыщенного лактона (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олида) при саркоме-45 // Вестник МАНЭБ, 11(8, вып. 2), стр.261-265, 2006.
6. *Казарян П.А., Элюян Д.В.* Хроматографические методы. М., ЦОЛИУВ, 50с., 1982.
7. *Казарян П.А., Егиазарян К.В.* Новое в гематологии и трансфузиологии. // стр. 174-179, Киев, 2007.
8. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году // 232с., 2013.
9. *Кренс Б.М.* Липиды клеточных мембран. Наука, Л. стр. 21-40, 1981.
10. *Пепанян А.А., Казарян П.А., Аветисян А.А., Галоян Г.М. и др.* Уровень адениннуклеотидов в некоторых тканях и эритроцитах крови при саркоме-45 до и после применения цианосодержащего лактона в эксперименте // Новое в гематологии и трансфузиологии, стр. 112-120, Киев, 2007.
11. *Перишин Г.Н.* Методы в экспериментальной химиотерапии. Медицина, 364-365, 1971.
12. *Шапот В.С.* Биохимические аспекты опухолевого роста. Медицина, М.: 314с., 1975.
13. *Шмаль Э.* Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
14. *Ghazaryan P.A., Ghazaryan V.V.* Membrane aspects of pathogenesis and therapy of cow's viral leukemia // International Congress of Microbiology. Brusel, - Abstr 11. 2003.
15. *Strittmatter W.J., Hirata F.* Biochem.biophys. Res. Commun, 88, 147-153, 1973.



Biolog. Journal of Armenia, Supplement 1 (66), 2014

## NEW DETAILS REGARDING XOR AS A PART OF THE BALANCED OXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE SYSTEMS

K.E. DANIELYAN

NAS, H. Buniatian Institute of Biochemistry, 5/1 Paruyr Sevak street, Yerevan 0014, Armenia  
Kristine\_danielyan@biochem.sci.am, danchrist743@yahoo.com

### Running title. Pyridoxine as an inhibitor for XOR.

The article is devoted to the analysis of the known oxidative and antioxidative systems of the cells with the special emphasize on the role of Xanthine Oxidoreductase (XOR) in these processes. Previous our experiments proved that XOR might have an undoubtable impact on the processes of cells development and proliferation as the enzyme responsible for the formation of reactive oxygen spices (ROS) as well as the final enzymes in the chain of purine catabolism, regulating it by the feed-back mechanism. Also, XOR and generated by its ROS influence on the formation of hydrogen peroxide of mitochondria and might be inhibited not only by the well-known synthetic compound - allopurinol but also might express favor to pyridoxine, which is the subcomponents of vitamin B complex.

*Xanthine Oxidoreductase - purine - catabolism - reactive oxygen spices -  
pyridoxine - allopurinol*

Հոդվածը նվիրված է հայտնի օքսիդատիվ և հակաօքսիդանտային համակարգերին: Հատուկ ուշադրություն է հատկացված քսանտինօքսիդորեդուկտազի (ՔՕՌ) դերի պարզաբանմանը այդ գործընթացում: Մեր անցյալ աշխատանքներում մենք ցույց ենք տվել, որ ՔՕՌ անկասկած ունի մեծ ազդեցություն բջջային զարգացման և պրոլիֆերացիայի վրա որպես պուրինային կատաբոլիզմի վերջնական ֆերմենտ, որը կարգավորում է այդ գործընթացը հակառակ կապի իմունքով: Բացի այդ, ՔՕՌ և սինթեզված այս ֆերմենտի կողմից ազատ ռադիկալները կարող են ազդել ջրածնի պերօքսիդի գոյացման վրա միտոքոնդրիումներում: Այս գործընթացը կարող է արգելակվել ոչ միայն սինթետիկ միացության՝ ալոպուրինոլի օգնությամբ, բայց նաև պիրիդոքսինի կիրառմամբ, որը հանդիսանում է վիտամինային B կոմպլեքսի բաղադրամաս:

*Քսանտինօքսիդորեդուկտազ - պուրին - կատաբոլիզմ - պիրիդոքսին -  
ալոպուրինոլ*

Статья посвящена анализу известных оксидативных и антиоксидантных систем. Особое внимание уделено рассмотрению роли КОР (ксантиноксидоредуктазы) в этих процессах. В предыдущих наших работах мы показали, что КОР имеет несомненное влияние на процессы развития и пролиферации клеток, как конечный фермент пуринового катаболизма, регулирующий его по принципу обратной регуляции. Более

того, КОР и генерированные им свободные радикалы могут влиять на формирование пероксида водорода в митохондриях. Этот процесс может быть не только ингибирован синтетическим соединением – аллопуринолом, но может быть подавлен пиридоксином, который является субкомпонентом витаминного В комплекса.

*Ксантиноксидоредуктазы - пурины - катаболизм - пиридоксин- аллопуринол*

### **Description of free radical producing systems in the organism**

ROS (reactive oxygen species) generation is the vitally important process. However, oxidative stress is determined as a misbalance between the formation of ROS and the utilization of the last one. Generation of ROS in the normally functioning cells occurs in the organelles, as it was suggested previously, and transfers into the cytoplasm. Overwhelming amount of ROS might trigger the non-reversible cell death.

It is supposed that mitochondria are the major reservoirs for ROS generation in most mammalian cells.

The respiratory chain is mainly localized in the inner membrane of the mitochondria and it is proved that the complexes I and III are the main responsible components of the chain for the production of the free radicals [1-4].

It is necessarily to mention, that 25% of free radicals formation occurs because of the protein folding in the ER [5]. Protein disulfide isomerase (PDI) and ER oxidoreductin 1 (ERO1) are two major enzymes responsible for oxidative protein folding in ER as well as for the catalyzing disulfide bond formation, isomerization, and reduction. In the process of oxidative protein folding, PDI receives electrons through catalyzing disulfide bond formation, and is converted to the reduced form, which then transfers electrons to ERO1 to recycle itself [6]. The synthesis of the ROS by PDI/ERO1 is regulated process, which might be controlled by the supply of the flavin adenine nucleotide for ERO1 [7]. Because the folding and misfolding process of the protein is the highly energy dependant, thus, the depletion of the ATP might trigger the formation of ATP in mitochondria and, consequently, the formation of ROS [8].

The leakage of  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the cytoplasm also might triggers the production of ROS in mitochondria [8,9].

NADPH oxidases (NOXs) are the enzymes, functioning of which might be the key regulators in the pathological processes such as ischemia-reperfusion, diabetes, neurodegenerative diseases and atherosclerosis, as well as vessels related other diseases [10-13]. The basic catalytic subunit of NOXs contains a C terminal dehydrogenase domain featuring a binding site for NADPH and a bound FAD, as well as an N-terminal domain consisting of six transmembrane alpha helices that bind two heme groups. Once activated, cytosolic NADPH transfers its electrons to FAD, which in turn passes electrons sequentially to the two hemes and ultimately to molecular  $\text{O}_2$ , forming superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) [14, 15]. Oxidants from various sources may affect the translocation of important regulatory subunits of NOX2 (and NOX1), p47phox, by oxidation of thiol groups in PKC with subsequent phosphorylation and translocation of these subunits to the membrane causing activation and superoxide formation by NOX2 (and NOX1). Likewise, those oxidants cause oxidation of thiols in protein disulfide isomerase (PDlox) leading to association with p47phox (maybe also NOXO1 or NOXA1), translocation of this dimer to the membrane, and activation of NOX2 (and NOX1).



Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) redox switches might be based on S-glutathionylation, PKC- and protein tyrosine kinase-2 (PYK-2)-dependent phosphorylation, oxidative BH<sub>4</sub> depletion, disruption of the zinc-sulfur cluster, as well as asymmetric dimethylarginine (ADMA) synthesis/degradation, all of which contribute to the regulation of its enzymatic activity. GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide [16].

Since AT-II-induced oxidative stress is largely due to activation of mtROS formation [17-19], the conversion of XDH to XO under chronic AT-II treatment or increased levels of this vasoconstrictor (e.g., in diabetes or hypertension) could be mainly driven by mtROS formation. A direct proof for the interaction between mt ROS and XO activity was based on the improvement of cardiac complications and XO activation in a model of heart failure by therapy with the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone [20, 21].

Hemoglobin and myoglobins might serve as a source for the formation of free radicals. Reduction of nitrite to ·NO under hypoxic conditions serving as a putative autoregulatory mechanism for capillaries and muscle [22]. Nitric oxide synthases are also might serve as a source of the ·NO [22].

The other enzyme, which will be highlighted in the frames of this paper is Xanthine Oxidoreductase (XOR). Under normal circumstances, most amount of this enzyme exists in the form of NAD-dependent cytosolic dehydrogenase (XDH).

#### **General description of XO enzy.**

Xanthine Oxidase (XO) as well as the XDH are two enzymes responsible for the last steps of purines metabolism, hydroxylation of a wide variety pyrimidine, pterin, and aldehyde substrate. XOR enzymes have been isolated from a wide range of organisms, from bacteria to man. All of these proteins have similar molecular weights and composition of redox centers [23, 24]. The mammalian enzymes, which catalyze the hydroxylation of hypoxanthine and xanthine, the last two steps in the formation of urate, are synthesized as the dehydrogenase form. XDH exist mostly as such in the cell but can be readily converted to the oxidase form XO by oxidation of sulfhydryl residues or by proteolysis. XDH shows a preference for NADH reduction at the flavin adenine dinucleotide (FAD) reaction site, whereas XO fails to react with NADH and exclusively uses dioxygen as its substrate, leading to the formation of superoxide anion and hydrogen peroxide [24]. The active form of the enzyme is that of a homodimer of molecular mass 290 kDa, with each of the monomers acting independently in catalysis. Each subunit contains one molybdopterin cofactor, two spectroscopically distinct [2Fe-2S] centers and one FAD cofactor. The oxidation of xanthine takes place at the molybdopterin center (Mo-pt) and the electrons thus introduced are rapidly distributed to the other centers by intramolecular electron transfer [25]. The full amino acid sequences of XOR enzymes from various sources have been deduced by sequencing of the respective cDNAs or genes. They all consist of approximately 1,330 amino acids and are highly homologous with, e.g., the bovine milk enzyme (1,332 residues) showing 90% sequence identity to the human liver enzyme (1,333 residues) [26]. Also, it is necessarily to mention that that main cellular localization of XOR is cytoplasm.

#### **XO regulates purine catabolism by feedback mechanism.**

There are numerous publications evidencing about the primer, regulating role of the hypoxanthine/xanthine existence and its catabolism in the row of the purine metabolic pathway [27-30].

For instance, Edwards NL et. al have performed the small clinical trial with the infusion of the radiolabeld [8-(14)C] adenine to four patients with gout as well as to the patients suffering from Lesch-Nyhan syndrome. Five days after infusion it became clear that the mean cumulative excretion of radioactivity after adenine administration to

patients not receiving and receiving (off and on) allopurinol therapy was 6.1% and 3.6% of infused radioactivity for gouty subjects and 15.9% and 20.8% for the Lesch-Nyhan patients.

By our own study with the utility of the different initial, not primer substrates for the XO we have noticed increase in the formation of the XO product – uric acid in vitro conditions (**figure 1**) [31].

Taking into the consideration, that the utility of allopurinol allows significantly to reduce activity of XOR, we have proved that XOR is the key regulative enzyme in the purine catabolism pathway. In our previous studies, we have demonstrated that inhibition of XOR activity with allopurinol might stimulate the in vitro process of cells proliferation [13], whereas the inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase might prevent brain derived cells from death [13]. Here, we have proved and presented the fundamental mechanism of such phenomenon, which might be utilized for regenerative processes stimulation or for the prevention of cells proliferation in the settings of cancer development.

Also, to prove whether the pure enzyme is able to react with the non-primer substrates, in this particular work we have checked the activity of purified XOR in the presence of histidine, one of the substrates, which was stimulating the activity of the enzyme very strongly.

We have noticed 10 times elevation of XOR activity in statistically significant way (control -  $1.63 \pm 0.20$ , xanthine -  $2.16 \pm 0.11$ , allopurinol -  $1.81 \pm 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). In the presence of histidine we haven't noticed any activity (histidine -  $1.77 \pm 0.30$ , allopurinol -  $1.15 \pm 0.20$ , **figure 2**).

#### **Influence of the generated in the cytoplasm free radicals on the activity of mitochondria**

Mitochondrial dysfunctions [e.g., by nitroglycerin metabolism, MnSOD deficiency, hypoxia, and electron transport chain (ETC) inhibitors] triggers mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and PKC-NADPH oxidase activation [20].

In our own work we have shown that activity of XO and ROS, generated by this enzyme might influence on the quantity of hydrogen peroxide in mitochondria (**figure 3**). Taking into the consideration, that pentylene-tetrazole is able to induced epileptic seizure, which might be determined mostly by deregulation of the mitochondrial processes as well as based on the fact, evidencing about the absence of XO in the mitochondrial fractions of the cells, we have concluded from performed our experiments, that allopurinol is able to influence on the activity of the XO, localized in the cytoplasm and diminish the hydrogen peroxide formation in the mitochondria.

Thus, if the above mentioned authors have shown data regarding the influence of mitochondrial functioning on the activity of the enzymes localized in the cytoplasm, we came to the contra verse conclusion.

#### **Antioxidant systems.**

In the conditions of the oxidative stress the organism over the evolution developed protective mechanism, which include the regulation on the gene expression and biochemical levels as the first step of triggering mechanism of defense. As soon as ROS production is enhanced 3 main components are activating, which are Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and antioxidant response elements (ARE). The binding of Nrf2 to the DNA sequences present in ARE induce transcription of cytoprotective, antioxidant genes including SOD, GPx, CAT, gamma-GCS, GST. In addition, several other cytoprotective genes (heme oxygenase, NQO-1) are induced. Under normal conditions (reduced intracellular conditions), Nrf2 is stabilized through binding to Keap-1 in the cytoplasm.

During enhanced ROS formation or exposure to electrophilic metabolites, the cysteine residues in Keap-1 are modified or oxidized causing the dissociation of Nrf2 and translocation to the nucleus and binding to the ARE. Depending upon the binding site present on the promoter region, the different antioxidant genes are induced [32].

Along with the above-mentioned proteins, the other family of the enzymes is responsible for the detoxification of the organism.

These antioxidant enzymes are subject to posttranslational modifications that temporally control their H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading activity to represent a mechanism to govern transient changes in local H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, important for redox signaling in response to specific stimuli or conditions.

A redox-signaling role for antioxidant enzymes is exemplified by Peroxiredoxins (Prxs). Prxs show high reactivity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared with other thiol oxidants and exhibit a rate constant ( $1.3 \cdot 10^7$  M/sec) sufficiently high to outcompete catalase and Gpx for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. During the catalytic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the active-site cysteine of Prxs occasionally interacts with two molecules of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resulting in hyperoxidation or sulfinylation (-SO<sub>2</sub>) and transient inactivation of Prxs, thereby enabling H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to target cysteines of local signaling proteins [33]. Transient recruitment of Prx2 to a growth-factor receptor provides both temporal and spatial control of local H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations at the focal point of signaling. A role of mitochondrial Prx3 for spatial control of local H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration is highlighted by a study showing that depletion of Prx3 enhanced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and apoptosis in cells stimulated with TNF-beta[34].

A screen of the S-nitrosoproteome in cultured endothelial cells identified Prx1 as an S-nitrosylated protein, raising the possibility that, in addition to control through cysteine oxidation, Prx1 activity is also subject to redox control by NO [35]. In a further layer of control, Prxs are subject to phosphorylation at Thr-90 by cyclin B-dependant kinase. In cells, Prx1 phosphorylation is observed primarily in cells during mitosis, implicating a role for a temporal increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in this phase of the cell cycle [36].

A.B. Fisher in his work states about Peroxiredoxin 6 (Prx6) antioxidative abilities. In accordance to his work data, Prx6 is the prototype and the only mammalian 1-Cys member of the Prdx family. Major differences from 2-Cys Prdxs include the use of glutathione (GSH) instead of thioredoxin as the physiological reductant, heterodimerization with pGSH S-transferase as part of the catalytic cycle, and the ability either to reduce the oxidized sn-2 fatty acyl group of phospholipids (peroxidase activity) or to hydrolyze the sn-2 ester (alkyl) bond of phospholipids (phospholipase A2 [PLA2] activity). The bifunctional protein has separate active sites for peroxidase (C47, R132, H39) and PLA2 (S32, D140, H26) activities. These activities are dependent on binding of the protein to phospholipids at acidic pH and to oxidized phospholipids at cytosolic pH. Prx6 can be phosphorylated by MAP kinases at T177, which markedly increases its PLA2 activity and broadens its pH-activity spectrum. Prx6 is primarily cytosolic but also is targeted to acidic organelles (lysosomes, lamellar bodies) by a specific targeting sequence (amino acids 31–40). Oxidant stress and keratinocyte growth factor are potent regulators of Prx6 gene expression. Prx6 has important roles in both antioxidant defense based on its ability to reduce peroxidized membrane phospholipids and in phospholipid homeostasis based on its ability to generate lysophospholipid substrate for the remodeling pathway of phospholipid synthesis [37].

Reversion of redox signaling requires reductive repair of reactive cysteines in proteins. An antioxidant enzyme responsible for the repair of oxidized protein cysteines is the 12-kDa oxidoreductase Trx [38]. Two types of Trx exist: Trx1 in the cytosol or Trx2 in the mitochondria, maintained in the reduced state via electrons donated by Trx1 or Trx2 reductase enzymes, respectively. The Trx family of proteins represents important regulators of cellular redox signaling by using Cys-32 and Cys-35 in the

conserved active- site motif (Cys-Gly-Pro-Cys) to reduce intra- or intermolecular disulfides or sulfenic acids present on proteins.

Recent findings on phenotypical alterations of mouse models with targeted disruptions of Prx genes are discussed, confirming the physiological functions of Prxs for antioxidant cell and tissue protection along with an important role as tumor suppressors [39].

As noted earlier, S-glutathionylation is an important redox-sensitive posttranslational modification that not only protects protein cysteines from irreversible oxidation but also alters protein function to control cell signaling. Grxs, members of the thioredoxin protein family, are glutathione-dependent oxidoreductase enzymes primarily responsible for reduction of S-glutathionylated proteins [38]. Two different glutaredoxins exist: Grx-1 in the cytosol and Grx-2 in the mitochondria. Grx-2, but not Grx-1, is an iron-sulfur protein [38]. The 2Fe-2S cluster bridges two molecules of Grx-2 to form an inactive dimer. Cluster destruction results in enzyme activation.

As the cluster is destroyed by ROS or RNS, the iron-sulfur cluster is considered a redox sensor that ensures Grx-2 activation during oxidative stress [40]. In contrast, Grx-1 is inactivated by S-nitrosylation of critical cysteines [40]. Recent work is beginning to address the roles of Grx in endothelial cells. For example, flow-induced activation of eNOS depends on the thiol-transferase activity of Grx-1 [41]. Upregulation of Grx-1 activity in response to TNF-beta participated in the cytotoxic action of the cytokine toward endothelial cells [42]. These studies demonstrate that Grx activity in endothelial cells can have beneficial or deleterious actions.

Most of the vasculature diseases related with the ROS generation are treated with the antioxidants, which are not too effective (vitamins C and E, and  $\beta$ -carotene). However, it is necessarily to mention that these compounds are able chemically remove from the model systems of vascular diseases excessive amount of ROS [43].

Explanations why vitamin E is ineffective during the clinical trials are perfectly suggested and described by Drummond G.R et al [44]. In accordance to him, the first most important reason why the clinical trial failed is the wide diversity of the diseases of the patients involved, particularly vascular diseases and the also the application of the vitamins was too late for the initiation of significant protection.

Along with the existing known antioxidants, we are proposing, proving and stating about the antioxidant abilities of pyridoxine, one of the subcomponents of vitamin B complex. We were also able to prove that pyridoxine, by suppressing the XO activity, might influence on the proliferative activity of the human brain derived primer cell culture [45].

We have determined the growth of the cells as well as their death in the presence of single components of vitamin B complex: nicotinamide, ribiflavine, pyridoxine and thiamine (1668,50 $\pm$ 189,51, 1738,33 $\pm$ 196,60; 2556,17 $\pm$ 355,68, 2179,00 $\pm$ 223,55, resp.). As a positive control in these experimental series bFGF was used. It is clear from the experiments that in comparison with the 2 types of negative controls: number of the cells on the 1<sup>st</sup> (820,14 $\pm$ 50,07) and 4th (1562,94 $\pm$ 146,45) days, as well as positive control-growth of the cells in the presence of bFGF (2131,08 $\pm$ 144,59); the most effective component of vitamin B complex was pyridoxine and thiamine. In comparison with the nicotinamide and riboflavin, these two components vividly have increased the growth of the cells even on the day 4th, (**figure 4**) [45].

It was also measured the size of the cells and cell bodies. It became clear for us that the most prominent compound, which induced the development of the small cells fraction and their enlargement in the statistically significant way in comparison with the control group.

Taking into the consideration the fact that the most of the components of vitamin B complex separately has the impact on the prevention of reactive oxygen species formation, influence on the cells growth and maturation, we have evaluated the activity of XO in the human brain derived cells in the presence of above mentioned subcomponents [46, 47]. In the first set of the experiments we have evaluated the XO activity in the presence of applied several concentrations of allopurinol 0,36 ug; 0,72 ug; 1,44 ug; 2,7 ug; 5,4 ug. ( $0.0393 \pm 3.9277 \times 10^{-3}$ ,  $0.0531 \pm 0.0236$ ,  $0.0252 \pm 9.1646 \times 10^{-3}$ ,  $0.0296 \pm 0.0105$ ,  $0.0157 \pm 2.6185 \times 10^{-3}$ ,  $0.0202 \pm 1.3092 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,05$  between the control, and 5,4 ug of allopurinol). As it is clear from the **figure 5 A**, allopurinol was inhibiting the activity of XO in the concentration dependent manner.

During the next set of the experiments, we have evaluated the influence of the vitamin B complex subcomponents on the activity of XO. In the **figure 5 B** it is presented the % of the XO inhibition in the presence of the subcomponents of B complex. The calculations are based on the quantity of detected uric acid normalized to 1 mg of the protein. Percentile of inhibition/ non inhibition of all subcomponents of vitamin B complex, thiamine, pyridoxine, riboflavin, nicotinamide, ( $-201,39 \pm 32,76$ ,  $160,00 \pm 60,00$ ,  $-120,91 \pm 39,091$ ,  $-152,73 \pm 107,27$ , resp.) were in statistically significant way different from the control sample ( $31,0343 \pm 6,9222$ ,  $p < 0,05$ ), which is the percentile of inhibition of XO in the presence of allopurinol and absence of subcomponents.

In our previous experiments we have shown that vitamin B complex initiates the cells' growth and maturation. Results presented in this article indicate that the all components of vitamin B complex are responsible for these functions. During the early period of the growth, important components responsible for these functions were thiamine and pyridoxine, riboflavin as well as nicotinamide. However, the most vivid difference might be detected in the groups treated with the pyridoxine and thiamine [48].

The size of the embryonic bodies, as well as smaller cells, was sensitive to the all components of vitamin B subcomponents. At day 12<sup>th</sup> the size of the small cells' fraction treated with the subcomponents of vitamin B complex was smaller in comparison with the control groups. Instead, the average size of the embryonic bodies in comparison with day 4<sup>th</sup> increased by 20% in the groups treated with the subcomponents, indicating on the fact that small cells were gathering together and forming larger embryonic bodies.

Our previous results [49] indicated that the early inhibition of the XO in the human brain derived cell culture utilizing allopurinol were initiating the increase in the number of the cells in comparison with the later stage of inhibition.

In comparison with the all other subcomponents of vitamin B complex, only in pyridoxine containing samples XO activity was specifically inhibited by allopurinol. Moreover, pyridoxine by itself was inhibiting formation of uric acid. In all the other samples XO activity wasn't inhibited with no any concentrations of allopurinol, probably due to the initiation of the alternative ways of uric acid formation.

Similarly, pyridoxine as allopurinol addition into the cells medium during the early stages of the treatment was initiating the increase in the number of the cells, whereas in the late stages that process was suppressed. During the late stages the most effective components were riboflavin and nicotinamide.

Moreover we have studied the influence of the different concentrations of pyridoxine on the activity of the purified XO (**figure 6**) and concluded that the effective impact of the compound is dose-dependent.

Equal influence in the cell culture has the allopurinol. We have proved our propose by the number of the data summarized in the publications [50,51].

### Conclusion.

Along with the existing systems of ROS generation we are highlighting XOR role in this processes and pointing on its impact on the hydrogen peroxide pool of mitochondria. As and final enzyme of purine catabolism XOR is able to stand as regulating enzyme and its' inhibition by known allopurinol as well as by newly delineated by us native compound – pyridoxine (figure 7).

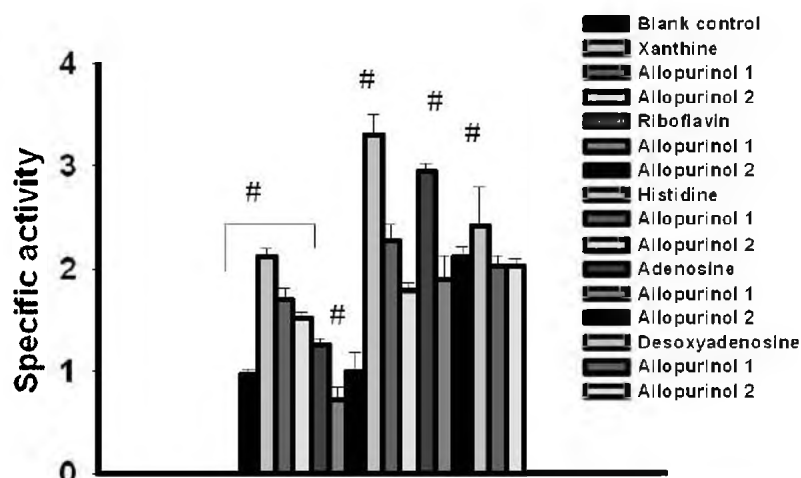


Fig. 1. Evaluation of XO specific activity in the presence of non-primer substrates.

The experiments were performed with the utility of the spectrophotometer Perkin-Elmer Coleman Model 620 and 635 Junior II Spectrophotometer ( $\lambda=660$  nm) for all type of the spectrophotometric investigations.

The first black column represents the specific activity of XOR, in the presence of xanthine (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ).

The all other substrates were applied in the same quantity. During the experiments were used allopurinol for the inhibition of XO activity in the concentration equal to the concentration of the substrates (Allopurinol 1) or higher twice (Allopurinol 2). It was used ONE-WAY-ANOVA, t-test for delineation of statistical significance of the experimental results for all type of the investigations. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

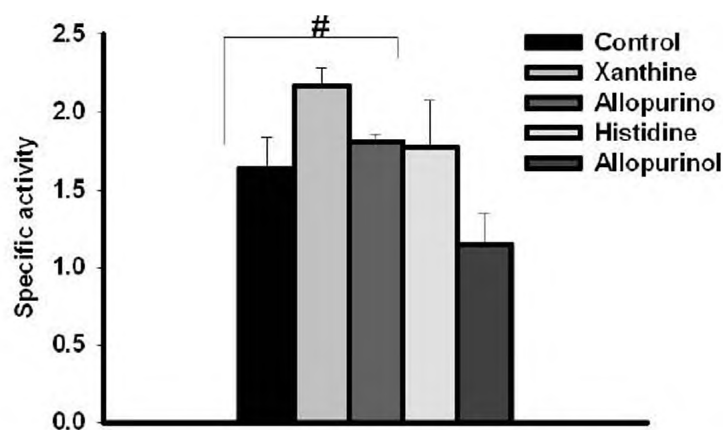
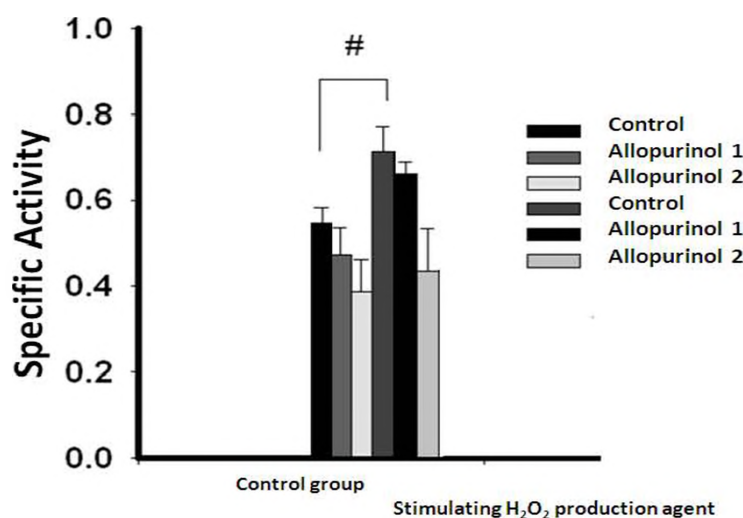


Figure 2. Determination of purified XOR activity in the presence of non-primer substrate.

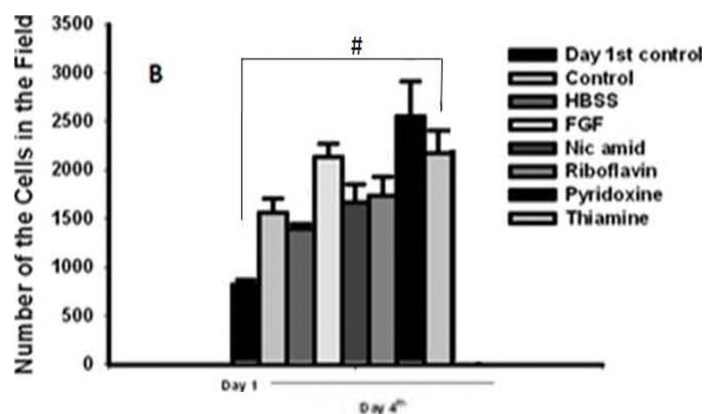
The second light grey column represents the specific activity of XOR, in the presence of xanthine (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ).

The histidine, allopurinol were applied in the same quantity.



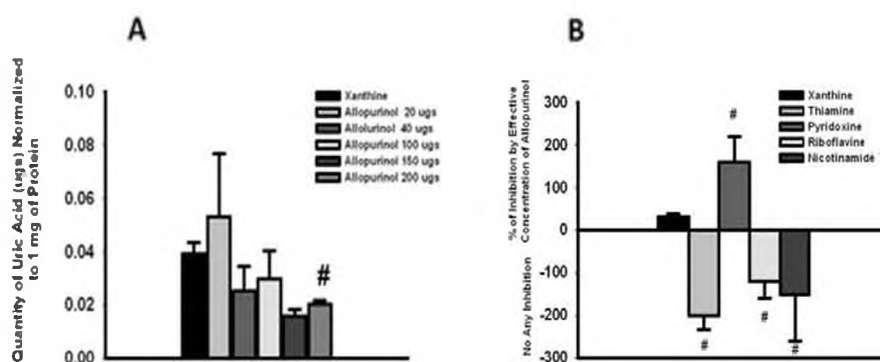


**Figure 3. Influence of the allopurinol mediated XO activity on the formation of hydrogen peroxide.**  
We had in our experiments two groups of the animals: injected with the pentylenetetrazole vs control native animals. In mitochondrial fractions we haven't detected the XO activity, however in the presence of allopurinol formation of hydrogen peroxide was elevated. It was used two concentrations of the allopurinol low and high, 0.06 ug and 0.12 ug.



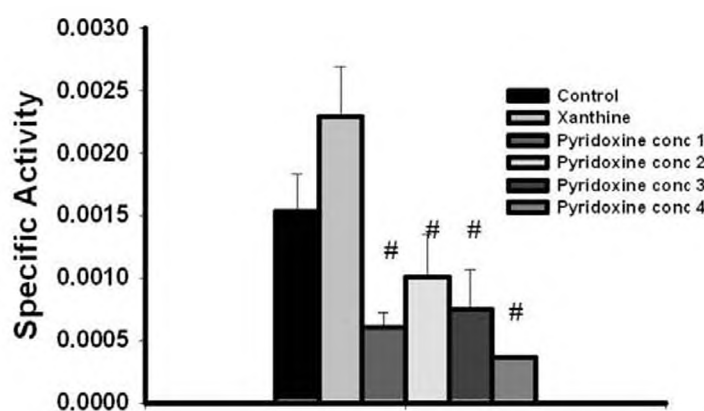
**Fig.4. The influence of the single components of vitamin B complex on the growth and development of the human embryonic brain cells. A. Presented are the pictures of the brain cells.**

Pictures are taken on day 1<sup>st</sup> and day 4<sup>th</sup>. Polarizing microscope Bipolar PI (PZO, Warsaw, Poland; magnification 60x1.25x40) was used. The cells were grown on the glass in the Petry dishes, covered with the Poly-L-Lysine. The Neurobasal/B27 containing bFGF, nicotinamide, riboflavin, pyridoxine, thiamine or low concentration of vitamin B complex was used as cell media. The number of the cells in the field was counted using the Pixcavator program, allowing to calculate automatically the size as well as the number of the cells.

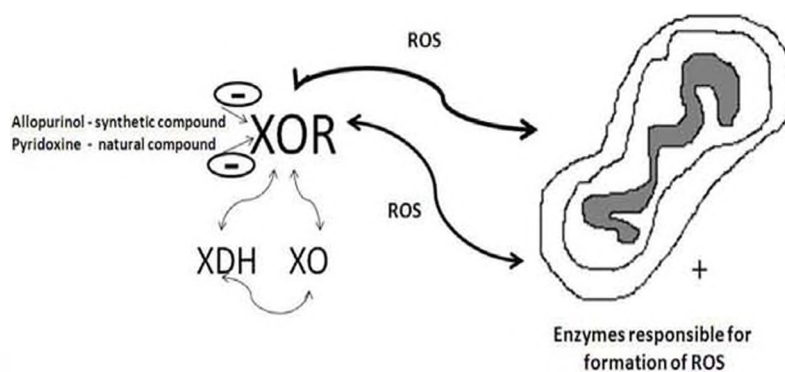


**Figure 5. Assessment of XO activity by the estimation of uric acid formation in the presence of allopurinol and vitamin B complex subcomponents.**

- A. Inhibition of uric acid formation in the human brain derived (E90) cells by the utility of allopurinol.  
 B. Percentile of inhibition of uric acid formation in the presence of vitamin B subcomponents.



**Figure 6. Influence of different concentrations of pyridoxine on the activity of XO.**  
 The experiments were performed similar to above mentioned conditions.



**Figure 7. Schematic representation of the new details regarding XO role as the part of oxidative and antioxidative system of the cells**



**Abbreviation.**

Xanthine Oxidoreductase (XOR)  
 Xanthine Oxidase (XO)  
 Xanthine Dehydrogenase (XDH)  
 Endoplasmatic Reticulum (ER)  
 Protein disulfide isomerase (PDI)  
 ER oxidoreductin 1 (ERO1)  
 NADPH oxidases (NOXs)  
 Superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ )  
 Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)  
 Molybdopterin center (Mo-pt)  
 Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT)  
 Permeability Transition Pore (mPTP)  
 Electron Transport Chain (ETC)  
 Mitochondria-targeted antioxidants (mitoTEMPO)  
 Angiotensin II (AT-II)  
 ATP-sensitive potassium channel (KATP)  
 mitochondrial membrane potential (mtJ)  
 Zinc-sulfur clusters (ZnCys3)  
 Nitric Oxide Synthase (eNOS)  
 Asymmetric Dimethylarginine (ADMA)  
 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)  
 Antioxidant Response Elements (ARE)  
 Peroxiredoxins (Prxs)

**REFERENCES**

1. *Drose S, Brandt U.* The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem*; 283:21649-21654, 2008.
2. *Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE.* Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*; 47:333-343, 2009.
3. *Lenaz G.* The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*; 52:159-164, 2001.
4. *Mukherjee A, Martin SG.* The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells. *Br J Radiol*; 1:S57-S68, 2008.
5. *Tu BP, Weissman JS.* Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*; 164:341-346, 2004.
6. *Marengo B, De Ciucis C, Verzola D, et al.* Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med*; 44:474-482, 2008.
7. *Tu BP, Weissman JS.* The FAD- and  $O_2^{\cdot -}$ -dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*; 10:983-994, 2002.
8. *Malhotra JD, Kaufman RJ.* Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a doubleedged sword? *Antioxid Redox Signal*; 9:2277-2293, 2007.
9. *Csordas G, Hajnoczky G.* SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta*; 1787:1352-1362, 2009.
10. *Bedard K, Krause KH.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*; 87:245-313, 2007.
11. *Cave AC, Brewer AC, Narayanananicker A, et al.* NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*; 8:691-728, 2006.
12. *Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V.* Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxid Redox Signal*; 11:841-860, 2009.
13. *Ray R, Shah AM.* NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*; 109:217-226, 2005.

14. *Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama TT.* Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal*; 11:2607-2619, 2009.
15. *Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V.* Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxid Redox Signal*; 11:841-860, 2009.
16. *Daiber A, Münzel T.* Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit: Experimentelle und Klinische Aspekte. Darmstadt, Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt, 2006.
17. *Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, et al.* Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res*; 107:106-116, 2010.
18. *Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI.* Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*; 102:488-496, 2008.
19. *Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al.* Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*; 45:438-444, 2005.
20. *Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A.* Mitochondrial Redox Signaling: Interaction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with Other Sources of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 2012.
21. *Gladde JD, Zelikson BR, Wei CC, et al.* Novel insights into interactions between mitochondria and xanthine oxidase in acute cardiac volume overload. *Free Radic Biol Med* 2011; 51:1975-1984.
22. *Kumar V, Calamara TD, Haeussler D, et al.* Cardiovascular redox and ox stress proteomics. *Antioxid Redox Signal*; 17(11):1528-59, 2012.
23. *Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K.* Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol*; 14(4):1321-1340, 1999.
24. *Hille R, Nishino T.* Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J*;9(11):995-1003, 1995.
25. *Olson JS, Ballou DP, Palmer G, Massey V.* The mechanism of action of xanthine oxidase. *J Biol Chem*;249(14):4363-82, 1974.
26. *Ichida K, Amaya Y, Noda K, et al.* Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene*; 133(2):279-84, 1993.
27. *Edwards NL, Recker D, Airozo D, Fox IH.* Enhanced purine salvage during allopurinol therapy: an important pharmacologic property in humans. *J Lab Clin Med*; 98(5):673-83, 1981.
28. *Edwards NL, Recker D, Fox IH.* Overproduction of uric acid in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. Contribution by impaired purine salvage. *J Clin Invest*; 63(5):922-30, 1979.
29. *Simmonds HA, Bowyer A.* Purine and pyrimidine excretion in psoriasis: a comparison with healthy controls during allopurinol therapy. *Br J Clin Pharmacol*; 1(2):107-11, 1974.
30. *Bleich S, Sillero MA, Torrecilla A, Sillero A.* Uric acid synthesis by rat liver supernatants from purine bases, nucleosides and nucleotides. Effect of allopurinol. *Cell Biochem Funct*; 12(4):237-45, 1994.
31. *Gyongyan SA, Manucharyan TG, Danielyan KE, Kevorkyan GA, Chailyan SG.* Xanthine oxidoreductase is a key enzyme of purine catabolism regulation. *Electronic Journal of Natural Science*; 2(21):17-21, 2013.
32. *Kalyanaraman B.* Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*; 1(1):244-257, 2013.
33. *Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, et al.* Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*; 300:653-656, 2003.

34. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem*; 279:41975-41984, 2004.
35. Yang Y, Loscalzo J. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102:117-122, 2005.
36. Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*; 277:25370-25376, 2002.
37. Chatterjee S, Feinstein SI, Dodia C, et al. Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J Biol Chem*; 286(13):11696-706, 2011.
38. Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn ME, Hudemann C, Lillig CH. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans*; 33:1375-1377, 2005.
39. Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal*; 7(5-6):768-77, 2005.
40. Hashemy SI, Johansson C, Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity. *J Biol Chem*; 282:14428-14436, 2007.
41. Wang J, Pan S, Berk BC. Glutaredoxin mediates Akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductasedependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 27:1283-1288, 2007.
42. Pan S, B.C. B. Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circ Res*; 100:213-219, 2007.
43. Morris CD, Carson S. Routine vitaminsupplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U. S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.*; 139:56-70, 2003.
44. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.*; 10(6):453-71, 2011.
45. Danielyan KE. Subcomponents of Vitamine B Complex Regulate the Growth and Development of Human Brain Derived Cells. *American Journal of Biomedical Research*; 1(2):28-34, 2013.
46. Lucius R, Mentlein R, Sievers J. Riboflavin-mediated axonal degeneration of postnatal retinal ganglion cells in vitro is related to the formation of free radicals. *Free Radic Biol Med*; 24(5):798-808, 1998.
47. Sheline CT, Zhou Y, Bai S. Light-induced photoreceptor and RPE degeneration involve zinc toxicity and are attenuated by pyruvate, nicotinamide, or cyclic light. *Mol Vis*; 16:2639-52, 2010.
48. Danielyan KE, Abrahamyan RA, al. e. Vitamin B Complex Provokes Human Embryonic Brain Cells Development and Growth in vitro. *Bull Exp Biol and Medicine*; 151(5):513-517, 2011.
49. Danielyan KE, Kevorkian GA. Xanthine oxidase activity regulates human embryonic brain cells growth. *Biopolym. Cell*; 27(5):350-353, 2011.
50. Danielyan KE. Dependence of Cells Survival from Xanthine Oxidase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Correlative Activities in Human Brain Derived Cell Culture. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 2013; in press.
51. Danielyan KE, Chailyan SG. Xanthine Dehydrogenase Inhibition Stimulates Growth and Development of Human Brain Derived Cells. *American Journal of Medical and Biological Research*; 1(4):95-98, 2013.



Биол. журн. Армения, Приложение 1 (66), 2014

## ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ЦИАНСОДЕРЖАЩИХ ЛАКТОНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ КОМПОНЕНТОВ ФОСФОИНОЗИТИДНОГО ЦИКЛА МЕМБРАН КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ САРКОМЕ - 45

<sup>1</sup> П.А. КАЗАРЯН, <sup>2</sup> Н.С. КАРАГУЛЯН

Греванский государственный университет  
Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна  
karagulyan2000@yandex.ru

Исследовалось содержание некоторых компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы мембран клеток селезенки при экспериментальной опухоли саркома-45. Установлено, что при этом происходит увеличение уровня моно-, ди- и трифосфоинозитидов, приводящее к нарушению коэффициентов их соотношений и деструктивным изменениям биомембран спленоцитов. После применения соединения циансодержащего лактона наблюдается определенная нормализация уровня изученных компонентов биомембран.

*Саркома-45- новое производное циансодержащих лактонов-  
фосфоинозитиды, фосфоинозитидный цикл- селезенка*

Ուսումնասիրվել է փայծաղի բջիջների թաղանթների ֆոսֆոինոզիտիդային ազդանշանային համակարգի որոշ բաղադրամասերի պարունակության փոփոխությունները փորձարարական ուռուցքի սարկոմա-45-ի ժամանակ: Հաստատված է, որ այդ պայմաններում դիտվում է մոնո-, դի- և եռֆոսֆոինոզիտիդների մակարդակների բարձրացում և նրանց հարաբերակցության գործակիցների փոփոխություններ:

Ցիան խումբ պարունակող չիագեցած լակտոնի օգտագործումից հետո տեղի է ունենում ուսումնասիրվող բոլոր ցուցանիշների որոշակի նորմալացում:

*Սարկոմա-45 - ցիան խումբ պարունակող չիագեցած լակտոնների նոր ածանցյալ –  
ֆոսֆոինոզիտիդներ - ֆոսֆոինոզիտիդային ցիկլ - փայծաղ*

The content of some components of phosphoinositide signaling system of splenocytes membranes in case of experimental tumour sarcoma-45 has been investigated. It has been established that under such conditions occurred a level growth of mono-, di- and triphosphoinositides leading to infringement of coefficients of their relations, as well as to destructive modifications of splenocytes biomembranes. After application of cyan containing lactone conjunction definite normalization of level of biomembranes' studied components is observed.

*Sarcoma-45-new derivative of cyanide lactone-phosphoinositides-phosphoinositide  
cycle-spleen*

За последние десятилетия в изучении причин и особенностей злокачественных новообразований онкологическая наука достигла больших успехов. Вместе с тем распространенность и смертность продолжают увеличиваться, что делает проблему злокачественного роста одной из самых актуальных в биологии и медицине.

С этой точки зрения определенный интерес представляет поиск новых противоопухолевых средств среди производных ненасыщенных пятичленных лактонов, многие представители которых обладают определенным канцеростатическим и канцеролитическим действием [1].

По современным представлениям одним из морфофункциональных локусов, вовлекаемых в механизмы канцерогенеза различной этиологии, является клеточная мембрана, в молекулярной организации и функционировании которой важная роль отводится фосфоинозитидам [2, 3].

Исследование молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий и выявление ответственных звеньев в нарушениях регуляции ионотранспортных сигнальных систем и метаболизма основных липидных компонентов биомембран в настоящее время приобретают все большую актуальность. Наиболее важные достижения в области понимания механизмов образования и развития злокачественных новообразований были достигнуты путем исследования механизмов сигнальной трансдукции, активированных в ткани данной опухоли, и выявления нарушенных метаболических процессов.

Имеющиеся литературные данные [4, 5] о роли фосфоинозитидных (ФИ) посредников в передаче сигнала при онкологических заболеваниях требуют выяснения механизмов запуска и регуляции ФИ сигнальной системы, обеспечивающей антиапоптоз как нормальных, так и опухолевых клеток. Установлена непосредственная связь нарушений функционирования фосфоинозитол-3-киназного каскада, являющегося важнейшим звеном ФИ-сигнальной системы, с возникновением различных опухолей [4-6]. Так, повышение активности фосфоинозитид-3-киназы – фермента дефосфолирующего ФИ, наблюдается при опухолях молочной железы [7]. Развитие опухолей эндометрия, связанное со снижением уровня фосфатазы, также ингибирует фосфоинозитидный каскад. Установлено, что опухоли лимфатической системы - лимфомы, а также нейробластома, остеосаркома и саркома Юинга, опухоли печени связаны с вовлечением ФИ-сигнальной системы [5, 8-10]. Не исключается возможность подключения других сигнальных систем с активацией ферментов регуляции процессов пролиферации, транскрипции и промоции опухолей [11, 12].

Очевидно, что понимание механизмов ФИ сигнальной системы в регуляции роста опухолей необходимо для разработки и поиска более эффективных схем лечения онкологических заболеваний.

В последние годы создан ряд нетоксичных ингибиторов ФИ-3-киназного сигнального пути, что позволяет разработать новые подходы для комбинированной противоопухолевой терапии [6, 13-15].

Учитывая вышеизложенное и исходя из неоспоримости роли биомембран в процессах трансформации нормальных клеток в опухолевые, нами были проведены исследования ранних этапов транслокации внешнего сигнала через плазматические мембраны клеток спленоцитов путем исследования некоторых компонентов ФИ сигнальной системы, в частности, монофосфоинозитидов (МФИ), дифосфоинозитидов (ДФИ) и трифосфоинозитидов (ТФИ).

Целью настоящей работы было исследование некоторых патогенетических механизмов развития опухолевого процесса при экспериментальной модели опухоли веретенноклеточного происхождения – саркомы-45 (S-45) и противоопухолевой активности нового производного цианосодержащих лактонов.

#### Материал и методика.

Эксперименты проводились на 42 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200г, разделенных на три группы. Первая - контрольная группа состояла из 10 интактных животных. Животным второй и третьей групп подкожно пересаживали опухолевый штамм S-45, полученный из опухолевого банка Онкологического центра МЗ РФ (Москва). Перевивку проводили в специальном боксе лаборатории токсикологии и химиотерапии Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии ГНТО НАН РА под руководством к.б.н. Р.Е. Мурадяна. Терапевтический эффект оценивали по степени ингибирования роста опухоли в процентах к контролю. Лечение было начато через 4 сут после перевивки. Цианосодержащее производное лактона вводили в течение 3 дней непрерывно, однократно в виде водного раствора (из расчета 17,5 мг/кг массы животного). Животных забивали под эфирным наркозом на 15-е сутки эксперимента методом декапитации. Мембраны клеток тимуса получали методом дифференциального центрифугирования. Затем методом тонкослойной хроматографии проводили выделение и фракционирование ФИ на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 мкм в системе хлороформ:метанол:аммиак (45:35:10) [17, 18]. Статистическую обработку данных проводили с учетом критерия достоверности по Фишеру - Стьюденту.

#### Результаты и обсуждение.

В результате проведенных экспериментов выявлены существенные количественные и качественные изменения в спектре ФИ (табл. 1).

Установлено, что формирование солидной опухоли саркомы-45 у экспериментальных животных приводит к значительному (почти двукратному,  $p < 0.01$ ) повышению уровня ТФИ в мембранах клеток селезенки. При этом отмечалась явно выраженная тенденция к снижению уровня ДФИ и МФИ.

Полученные данные о количественных сдвигах компонентов фосфоинозитидного цикла свидетельствуют об активации ФИ сигнальной системы, что характерно для опухолевой трансформации, когда клетки теряют способность использовать защитные механизмы, что приводит к блокированию апоптоза [14].

**Таблица 1.** Количественные изменения абсолютного уровня ФИ клеток ткани селезенки при саркоме-45 и после применения нового цианосодержащего лактона  
(мкг Р на 1г свежей ткани)

| ФИ  | Контроль<br>(n=10) | Саркома-45<br>(n=20) | Лечение<br>(n=22)  | $P_1$ | $P_2$ | $P_3$ |
|-----|--------------------|----------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| ТФИ | 395.6 $\pm$ 21.18  | 628.8 $\pm$ 33.16    | 528.2 $\pm$ 20.75  | <0,01 | <0,05 | <0,05 |
| ДФИ | 595.1 $\pm$ 15.46  | 572.9 $\pm$ 25.16    | 471.3 $\pm$ 18.28  | >0,05 | <0,05 | >0,05 |
| МФИ | 473.8 $\pm$ 17.14  | 435.8 $\pm$ 47.12    | 301.75 $\pm$ 12.64 | >0,05 | <0,01 | <0,05 |

Примечание.  $P_1$  – сравнение данных при саркоме-45 с контролем

$P_2$  – сравнение данных при саркоме-45 с данными после лечения

$P_3$  – сравнение данных после лечения с контролем

Анализ полученных данных выявил глубокие изменения метаболизма изученных компонентов фосфоинозитидного цикла в мембранах клеток селезенки

экспериментальных животных при саркоме-45. Накопление ТФИ способствует опухолевому росту, что согласуется с нашими морфологическими данными. Высокое содержание ТФИ и фосфатидных кислот (ФК) [2] возможно обусловлено подавлением активности фосфолипазы С - фосфоинозитидспецифичной фосфатазы и фосфатидатфосфатазы (соответственно).

Особый интерес представляют результаты проведенных нами исследований по изучению количественных и качественных изменений в спектре ФИ мембран клеток селезенки после применения нового производного (2-циан-3,4,4-триметил-2-бутен-4-олид) циансодержащих лактонов. Установлено, что после применения этого соединения отмечается явно выраженная тенденция к нормализации уровня полифосфоинозитидов. Так, применение исследуемого лактона приводит к определенной нормализации содержания ТФИ в клеточных мембранах селезенки. В этих условиях абсолютный уровень ДФИ и МФИ незначительно снижается.

Более глубокий анализ полученных результатов, касающихся изучения особенностей изменения величин коэффициентов соотношений отдельных фракций ФИ, выявил неоднозначность характера их изменений. Так, при исследуемой патологии величины коэффициентов соотношений ТФИ/ДФИ и ТФИ/МФИ, а также ДФИ/МФИ возрастают (рис.1), что свидетельствует об ускорении процесса деградации компонентов фосфоинозитидного цикла. После введения циансодержащего производного лактона коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра ФИ при исследуемой патологии почти полностью нормализуются.

Таким образом, полученные нами данные являются доказательством нарушения регуляции фосфоинозитидного цикла при саркоме-45, следовательно и ФИ сигнальной системы, обеспечивающей транслокацию внешних сигналов, что позволяет контролировать такие кардинальные клеточные функции, как пролиферация и апоптоз.

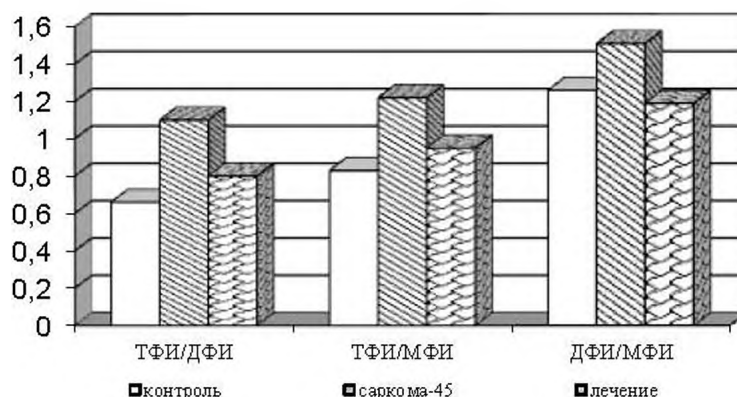


Рис. 1. Коэффициенты соотношений абсолютных величин спектра фосфоинозитидов в ткани селезенки при саркоме-45 и после введения циансодержащего лактона

Нет сомнений, что вышеуказанные изменения в уровне важнейших компонентов этого каскада, в частности липидных вторичных посредников, может привести к нарушению деятельности функциональной активности биомембран, тем самым влияя на защитные механизмы, способствуя развитию злокачественных новообразований.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном воздействии изученного препарата на состояние компонентов фосфоинозитидного цикла, что приводит к стабилизации биомембран и восстановлению функциональной активности клеток тимуса.

Применение нового цианосодержащего производного лактона указывает на его эффективность и, возможно, на противоопухолевую активность при саркоме-45, что дает предпосылки для дальнейших целенаправленных исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян А.А., Токмаджян Г.Г. Биологически активные производные 2-бутен- и 3-бутен-4-олидов. Хим. ж. Армении, 46(3-4), 219-236, 1993.
2. Вересов В.Г., Кабак А.Г., Вологовский И.Д. Модель динамики внутриклеточного кальция, основанная на уточненной кинетике ингибирования инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительного кальциевого канала. Биофизика. 47(1), с.31-37, 2002.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Овчинникова Л.К. Роль ядерного транскрипционного фактора NF-карра в этиологии, патогенезе и клиническом течении рака молочной железы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 5, с.10-13, 2009.
4. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. Пушино, с.150, 2003.
5. Зубер В.Л. Выделение полифосфоинозитидов. Методы биохимических исследований. (Учебное пособие под ред. Прохоровой М.И.), с.72-80. Л., 1982.
6. Казарян П.А., Элюян Д.В. Хроматографические методы. ЦОЛИУВ, с.28-40, М.1982.
7. Карагулян А.С. Роль нового производного цианосодержащих лактонов в регуляции метаболизма компонентов фосфоинозитидного цикла мембран клеток тимуса при саркоме-45. Доклады НАН РА. 112 (3), с 297-302, Ереван 2012.
8. Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Феофанова Н.А. PI3-киназы в иммунопатологии. Иммунология, 2, с.136-139, 2009.
9. Слюсарь Н.Н. Роль фодфоинозитидов и их метаболитов в онкогенезе: Дисс.докт.мед.наук.СПб. с.286-290, 1993.
10. Чернов В.А., Богомолова Н.С., Минакова С.М., Сускова В.С. Фармакокинетика проспидина и крыс. Фармакокинетика и метаболизм лекарственных препаратов. М, 1978.
11. Шатская В.А., Красильников М.А., Павличенко О.В. Значение фосфатидилинозитольного сигнального пути в развитии перекрестной устойчивости опухолевых клеток к гормональным цитостатикам и гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2, с.206-210, 2007.
12. Шаповал А.О. Роль фосфатидил-3-киназы в развитии онкологических заболеваний. Вопросы онкологии. 48, с.644-654, 2002.
13. Ghazaryan P. A., Galoyan G.M., Karagulyan A.S. The regulation of metabolism of cellular lipids using a cyan-containing derivative of lactone associated with sarcoma-45. International Society of Haematology Congress, European&African Divison, Budapest, Hungary, abstr. P030, 2007.
14. Ghazaryan P.A., Panosyan T.R., Ghochikyan T.V., Harutunyan V.S., Ghazaryan A.P. Exchange of membrane phospholipids metabolism and ion-transport enzymatic systems activity at sarcoma-180 and after using VAS-167. International Conference «Actual Issues of Haematology and Transfuziology». Yerevan-Stepanakert. J. Blood., 1(10), p.24, 2010.



15. Kingsbury S.R., Gout I.T. Phosphoinositide-3-kinases and cancer. *Experimental Oncology.*, 25, p.3-15, 2003.
16. Pendaries C., Tronchera N., Plantavid M., Payraastre B. phosphoinositide signaling disorders in human diseases *FEBS Lett.*, 546, p.25-31. 2003.
17. Toker A. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci.*, 59, p.761-779, 2002.
18. Toretsky J.A., Thaker M., Eskenazi A.E., Frantz C.N. Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewings sarcoma family of tumors. *Cancer Res.*, 59, p.5745-5750, 1999.

Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

# ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *in vitro* НОВЫХ НАПОРАЗМЕРНЫХ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ЦИСПЛАТИНА

**И.А.КАЗАРЯН<sup>1</sup>, Н.С. БАБАЯН<sup>2</sup>, Р.М. ГРИГОРЯН<sup>2</sup>, Н.К. САРКИСЯН<sup>2</sup>,  
Д.А.ПОГОСЯН<sup>2</sup>, З.М.ФАРМАЗЯН<sup>3</sup>, Е.Р.АРАКЕЛОВА<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Российско - Армянский (Славянский) университет

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии ИАИ РАН

<sup>3</sup>Государственный инженерный университет Армении  
shkazarian1@gmail.com

На протяжении последнего десятилетия фармакологические компании всего мира были нацелены на создание противоопухолевых препаратов нового поколения. Однако проблемы, связанные с малой селективностью по отношению к опухолевым клеткам, высокой токсичностью по отношению к здоровым тканям и органам, быстрым привыканием опухолевых клеток все еще являются непреодолимым барьером в ходе этого процесса. Одним из приоритетных направлений в решении данных проблем являются нанотехнологии, которые предоставляют возможность целенаправленной доставки лекарств в опухолевые клетки, при этом сводя к минимуму токсическое воздействие на здоровые. В работе представлены данные исследования *in vitro* противоопухолевой активности и опухолевой специфичности наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина, соединенного с различными полимерными типами поливинилалкоголя. Было выявлено, что наличие в структуре наночастиц ZnO обуславливает опухолевую специфичность препаратов. Также было показано, что в составе наноразмерных композитов происходит резкое понижение уровня базальной цитотоксичности цисплатина. Исследованные композиты обладают более высоким уровнем опухолевой специфичности по сравнению с цисплатином, а их противоопухолевая активность обусловлена цитостатическим эффектом, которая приводит к смерти опухолевых клеток по апоптотическому пути.

Цисплатин - ZnO - нанотехнология - противоопухолевая активность -  
цитотоксичность

Վերջին տասնամյակի ընթացքում ամբողջ աշխարհի դերաբանական կազմակերպությունները նպատակաուղղված են ստեղծելու նոր սերնդի կապալուծուցքային դեղամիջոցներ: Սակայն խնդիրներ՝ կապված ուռուցքային բջիջների նկատմամբ փոքր ընտրողականության, առողջ հյուսվածքների և օրգանների կկատմամբ բարձր տոկոսկիության հետ և ուռուցքային բջիջների արագ հակման հետ՝ դեռևս անհաղթահարելի խոչընդոտ են հանդիսանում այս գործընթացում: Տվյալ խնդիրների լուծման մեջ առաջնապահայինն ուղղություններից մեկն են հանդիսանում նաև ստեխնոլոգիաները, որոնք կհաղափորտություն են տալիս դեղամիջոցների կապալուծողական առաքումը:

դեպի ուռուցքային բջիջները, միաժամանակ առողջ բջիջների նկատմամբ տոկսիկ ազդեցությունը հասցնելով նվազագույնի: Աշխատանքում ներկայացված են հակաուռուցքային ակտիվության և ուռուցքային յուրահատկության տվյալները նանոչափսային ZnO միացությունների ցիտատոքսիկ և տարբեր տիպի պոլիմերային կոմպոզիտների հիման վրա *in vitro* պայմաններում: Նաև ցույց է տրվել, որ նանոչափսային միացությունների կազմության մեջ կատարվում է ցիտատոքսիկ բազային ցիտոստատիկության մակարդակի կտրուկ նվազում: Հետազոտված միացությունները օժտված են հակաուռուցքային ակտիվության ավելի բարձր մակարդակով, քան ցիտատոքսիկ և նրանց հակաուռուցքային ակտիվությունը պայմանավորված է ցիտոստատիկ ազդեցությամբ, որը բերում է ուռուցքային բջիջների մահվանը ապոպտոտիկ ճանապարհով:

Ցիտատոքսիկ - ZnO - նանոտեխնոլոգիաներ - հակաուռուցքային ակտիվություն - ցիտոստատիկություն

Over the last decade pharmaceutical companies around the world were aimed at creating a new generation of anticancer drugs. However, the problems connected with low selectivity of tumor cells, high toxicity to healthy tissues and organs, rapid habituation of tumor cells still are unsurmountable barrier during the process. One of the priorities in addressing these problems are nanotechnology that enable targeted drug delivery to tumor cells and at the same time minimize toxic effects on the healthy ones. The paper presents research data on *in vitro* antitumor activity and tumor specificity nanoscale ZnO composites based on cisplatin, which is coupled with different types of polymer polyvinyl alcohol. It has been found that the presence of nanoparticles in the structure of ZnO causes tumor specificity of drugs. It has also been shown that there is a sharp reduction of Cisplatin basal cytotoxicity level in the composition of nanoscale composites. Studied composites have higher level of tumor specificity in comparison with Cisplatin, and their antitumor activity is caused by the cytostatic effect, which leads to tumor cell death by apoptotic pathway.

Cisplatin - ZnO - nanotechnology - antitumor activity - cytotoxicity

Применение достижений нанотехнологии в медицине предоставляет возможность не только диагностировать опухоль, но и позволяет лечить опухолевые болезни путем точечного воздействия на опухолевые клетки. Считается, что наночастица не изменяет механизм действия того лекарства, с которым она связана в составе композита. Наночастица лишь способствует лучшему проникновению вещества в клетку, и в зависимости от размера наночастиц наблюдается тот или иной эффект [3]. Так, считается, что оптимальное проникновение композита в опухолевую клетку обеспечивается в тех случаях, когда размер наночастиц составляет приблизительно 10-100 нм. Следует отметить также, что наночастицы размером 100 нм и более способны проникать в здоровые гепатоциты, таким образом проявляя гепатотоксичность [2].

В последнее десятилетие в качестве конъюгата лекарственных препаратов широко используются органические полимеры. Это способствует доставке лекарства к опухолевым клеткам за счет механизма пассивного транспорта конъюгата к опухолевым клеткам и его проникновения через сосудистые стенки опухолевых тканей. К органическим полимерам, используемым в медицине в качестве наночастиц, существуют свои требования, к которым относятся химическая инертность, нетоксичность, растворимость в воде, амфифильность, отсутствие примесей, возможность регулировать химические свойства, биосовместимость и возможность биodeградации [5].

Ранее было показано, что наночастицы ZnO запускают свободно-радикальные механизмы в делящихся опухолевых клетках, не повреждая нормальные неделящиеся клетки [1]. Во многом это и стало определяющим фактором в использовании именно наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина в исследованиях противоопухолевой активности. Показано также, что ZnO и цисплатин способны проявлять синергичный противоопухолевый эффект.

В работе представлены данные противоопухолевой активности и опухолевой специфичности новых наноразмерных композитов ZnO на основе цисплатина, соединенного с различными полимерными типами поливинилалкоголя (ПВС-5 и МПВС-13). Были исследованы также механизм противоопухолевой активности и путь клеточной гибели *in vitro*.

#### Материал и методика.

Исследованные соединения: образцы ПВС-5 и МПВС-13 были синтезированы в два этапа:

1. полимеризация винилацетата с мономерами, содержащими карбоксигруппу (производные малеинового ангидрида)
2. последующий щелочной алкоголиз поливинилацетата или его кополимеров

Содержание функциональных групп в ПВА (поливинилацетат) контролировалось путем изменения состояния синтеза. Содержание функциональных групп в кополимерах определялось путем химического анализа и кондуктометрического титрования. Молекулярная масса полимеров определялась с помощью гель-хроматографии («Waters» хроматограф). На рис. 1 представлено схематическое изображение ПВС-5 и МПВС-13, которые имеют схожее строение мономеров [8].

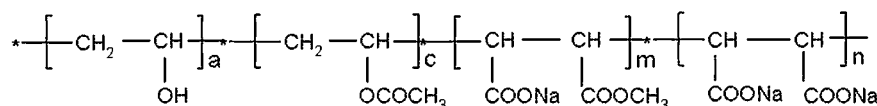


Рис. 1. Схематическое строение мономера ПВС-5 и МПВС-13 полимеров

Характеристики ПВС-5 и МПВС-13 представлены в табл 1.

Таблица 1. Характеристика структуры ПВС-5 и МПВС-13.

| Производные ПВС | Молекулярная масса | Процентное содержание функциональных групп, % |      |      |
|-----------------|--------------------|-----------------------------------------------|------|------|
|                 |                    | a*                                            | c*   | m+n* |
| ПВС-5           | 65 000             | 98,4                                          | 1,6  | -    |
| МПВС-13         | 58 000             | 83,3                                          | 13,9 | 2,8  |

\* Функциональные группы a, c и m+n представлены на рис. 1.

**Клеточные линии:** использовали опухолевые (HeLa и KCL-22) и нормальные (MRC5) клеточные линии человека. Клетки культивировали при 37°C в ростовой среде DMEM (HeLa и MRC5) и RPMI-1640 (KCL-22) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

**Определение цитотоксичности и опухолевой специфичности:** клетки HeLa и MRC5 в концентрации  $0,2-0,25 \times 10^6$  кл./мл культивировали в 96-луночных планшетах в течение 48 ч, после чего к ним добавляли исследуемое вещество в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 и 100 мкг/мл. Через 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток с помощью NRU анализа согласно стандартному протоколу [9]. Измерения проводили с использованием, Microplate ELISE reader (Human Reader HS, Germany). Клетки KCL-22 в концентрации  $0,5 \times 10^6$  кл./мл культивировали во флаконах в течение 48 ч, после чего к ним добавляли исследуемое вещество в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 и 100

мкг/мл. Через 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток методом исключения витального красителя трипанового синего [4] с помощью камеры Горяева.

**Исследование клеточного цикла и механизма клеточной смерти** проводили на клеточной культуре KCL-22 с помощью проточной цитометрии. Клетки обрабатывали исследуемым веществом в концентрациях  $IC_{50}$  и  $IC_{50/2}$  в течение 48 ч, после чего их промывали буфером PBS и фиксировали в холодном 70 %-ном этаноле при 4°C, далее проводили их окрашивание PI (0,1 мг/мл RNase и 0,05мг/мл пропидиум йодид) в течение 30 мин. [7]. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (Beckton & Dickinson, San Jose), данные анализировали с помощью программы Modfit4.0.

Для анализа механизма клеточной смерти после фиксации клетки дважды промывали буфером (Cell Staining Buffer+ PBS+ 0.5% BSA+ 0/1%  $NaN_3$ ), ресуспендировали в Annexin V Binding Buffer и добавляли 7-AAD и Annexin V. После 15 мин инкубации добавляли Annexin V Binding Buffer [8]. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (Beckton & Dickinson, San Jose), данные анализировали с помощью программы FlowJo 8.7.

Все эксперименты были проведены трижды, по крайней мере, в четырех экземплярах для улучшения статистического значения. Все значения представлены как средние  $\pm$  стандартная ошибка. Для статистической обработки данных использовался t-тест Стьюдента, за статистическую погрешность принималась  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение.

Данные цитотоксичности ( $IC_{50}$ ) и индекса опухолевой специфичности (ИС) исследованных соединений представлены в табл. 2.

Таблица 2. Цитотоксичность и индекс опухолевой специфичности цисплатина и его наноразмерных композитов.

| Вещество          | $IC_{50}$ в опухолевых клетках (HeLa) | $IC_{50}$ в нормальных клетках (MRC-5) | ИС                 |
|-------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|
| МПВС-13+CisPt     | 36                                    | 3                                      | 0.083*             |
| МПВС-13+CisPt+ZnO | 28                                    | 54                                     | 1.93*              |
| ПВС-5+CisPt       | 56                                    | 44                                     | 0.79*              |
| ПВС-5+CisPt+ZnO   | 39                                    | 58                                     | 1.48*              |
| CisPt             | 2.1                                   | 2.4                                    | 1.14 <sup>ns</sup> |

<sup>ns</sup> – недостоверное отличие,  $p > 0,05$ ; \* - достоверное отличие,  $p < 0,05$

Был выявлен высокий уровень цитотоксической активности цисплатина по отношению к нормальным и опухолевым клеткам. Будучи очень токсичным веществом, цисплатин не проявил избирательности по отношению к опухолевым клеткам в условиях *in vitro*. Полимеры МПВС-13, ПВС-5 и ZnO в исследуемых концентрациях не проявили цитотоксического эффекта ни в отношении опухолевых, ни в отношении нормальных клеток. Таким образом, МПВС-13 и ПВС-5 соответствуют требованиям, предъявляемым органическим нанополимерам, используемым в медицине.

Было показано, что МПВС-13+CisPt и ПВС-5+CisPt без нанопленки ZnO не обладают опухолевой специфичностью и являются более токсичными для нормальных клеток. Но введение в состав данных композитов нанопленки ZnO резко изменяет характеристику их специфичности. Добавление слоя ZnO к композиту МПВС-13+CisPt в 18 раз снизило токсичность композита по отношению к нормальным клеткам и в 1.3 раза повысило ее для опухолевых. Было показано, что МПВС-13+CisPt+ZnO почти в 2 раза более активен, чем цисплатин.

Таким образом, можно сделать вывод, что добавление нанопленки ZnO приводит к опухолевой специфичности композита. Композиты МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO являются менее токсичными для нормальных клеток и более избирательными к опухолевым клеткам, чем чистый цисплатин и композиты состава МПВС-13+CisPt и ПВС-5+CisPt.

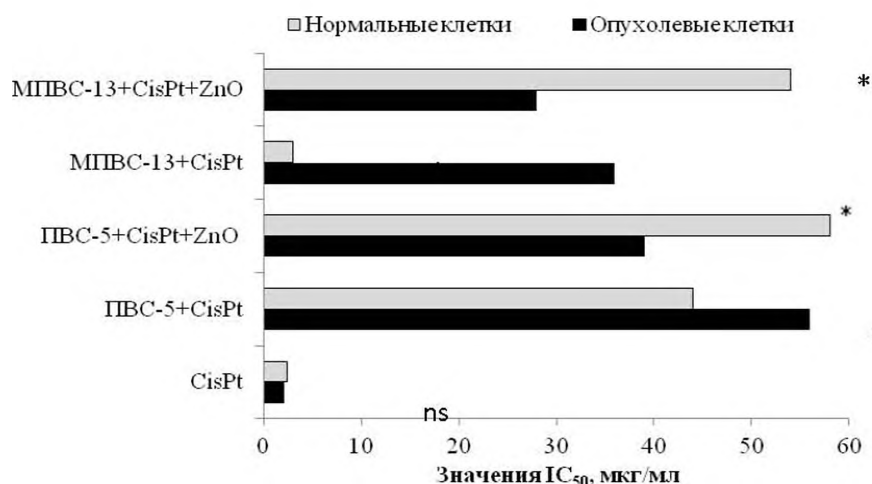


Рис. 2. Опухолевая специфичность исследованных композитов (ns-недостовверное различие,  $p>0,05$ ; \*-достовверное различие,  $p<0,05$ ).

Анализ изменения клеточного цикла при воздействии композита был проведен для наиболее активного с точки зрения опухолевой специфичности композита МПВС-13+CisPt+ZnO. Результаты анализа клеточного цикла клеток KCL-22 методом проточной цитометрии после воздействия композитом МПВС-13+CisPt+ZnO и чистым цисплатином представлены на рис.3. Первый большой пик на каждом графике составляют клетки в G0/G1-фазе (содержание ДНК 2с) клеточного цикла, последующее плато составляют клетки в S- фазе клеточного цикла (содержание ДНК от 2с до 4с). Второй пик составляют клетки в G2/M-фазе (4с).

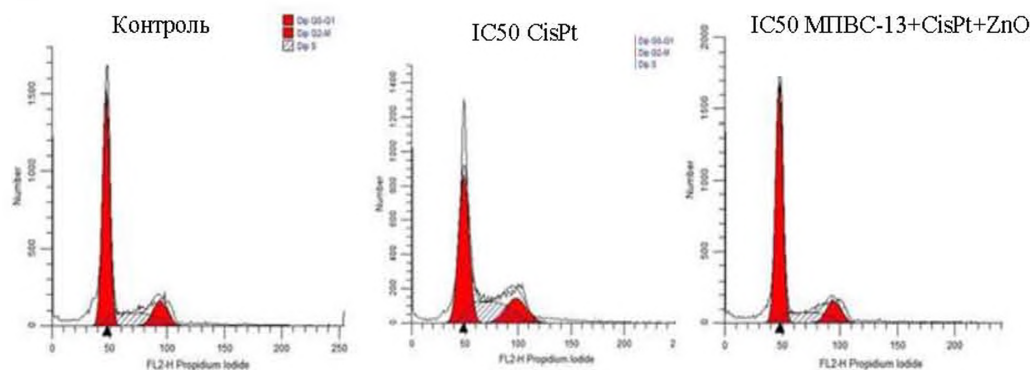


Рис.3 Клеточный цикл после 48 ч инкубации клеток KCL-22 с цисплатином и композитом МПВС-13+CisPt+ZnO в концентрациях, равных их IC<sub>50</sub>.

Было обнаружено, что при воздействии МПВС-13+CisPt+ZnO происходит незначительное уменьшение количества клеток в S- и G2/M-фазах, однако увеличивается количество клеток в G0/G1- фазе. Это означает, что композит МПВС-13+CisPt+ZnO задерживает клеточный цикл в G0/G1- фазе, не позволяя клеткам входить в синтетическую фазу. В сравнении с цисплатином, который приводит к задержке клеточного цикла в S-фазе, композит МПВС-13+CisPt+ZnO проявил более слабый цитостатический эффект (рис. 4).

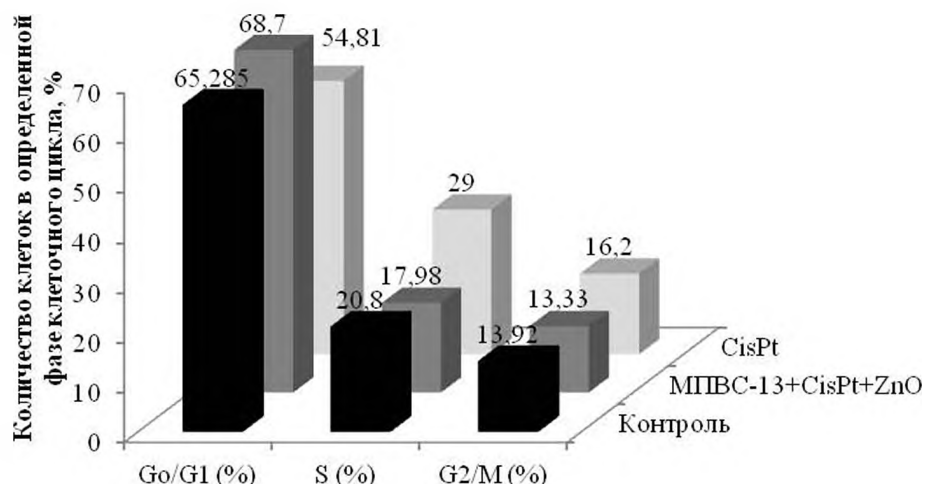


Рис. 4. Анализ изменения распределения клеток по клеточному циклу после воздействия композитом МПВС-13+CisPt+ZnO и CisPt в концентрации IC<sub>50</sub>.

Важной характеристикой цитостатических соединений является также то, что в результате блокирования клеточного деления клетки погибают по апоптозному пути, что является предпочтительным при терапии опухолей, так как это позволяет ослабить воспалительную реакцию, индуцированную некротическими клетками или исключить ее полностью. Анализ механизма клеточной смерти выявил, что при воздействии композитом МПВС-13+CisPt+ZnO в субтоксической дозе 21% всех живых клеток вошли в стадию апоптоза.

Таким образом, наличие в структуре МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO композитов нанопленки ZnO приводит к повышению опухолевой специфичности (в 23,3 и 1,9 раза соответственно). Также было определено повышение опухолевой специфичности для данных композитов по сравнению с чистым цисплатином. Изучение противоопухолевой активности композита МПВС-13+CisPt+ZnO выявило увеличение опухолевой специфичности почти в 2 раза, по сравнению с таковой для чистого цисплатина. Результаты изучения противоопухолевой активности МПВС-13+CisPt+ZnO и ПВС-5+CisPt+ZnO *in vitro* показывают высокий потенциал наноразмерных композитов ZnO для использования в противоопухолевой терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аракелова Э.Р., Хачатрян А.М., Авджакян К.Э., Арамян Н.С., Геворкян В.А., Григорян С.Г., Мирзоян Г.Н. «Осаждение высокоомных ориентированных пленок ZnO при низких температурах методом DC- магнетронного напыления на стеклянных, Si и PEDOT-PSS, PEDOT-PSS (ПВС) подложках», Известия НАН Армении, Физика, 46(6), 451-460, 2011.
2. Девис М. «Терапия наночастицами: новый способ лечения рака», <http://www.foodingredients.ru>
3. Терещенко В. П., Картель Н. Т. «Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогноз», Киев «Наукова думка», 2010.

4. Bio-Protocol, «Propidium Iodide Staining of Cells for FACS Analysis», <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=195#.U1D09KLcTcc>, 2012.
5. Medina C., Santos-Martinez M. J., and Radomski M.W. «Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance», *Br J Pharmacol.* 150(5):552-8, 2007.
6. Rasmussen et al. «Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications», *Expert Opin Drug Deliv.* 7, 1063-1077, 2010.
7. Sigma Aldrich, «Annexin V-FITC Apoptosis Detection», <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/apoafbul.pdf>, 2012.
8. Sigma Aldrich, «In vitro toxicology kit Neutral Red», <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox4bul.pdf>, 2010.
9. Sigma Aldrich, «Trypan Blue solution. Cell Culture Tested», <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html#trypan-blue>, 2012.





Biolog. Journal of Armenia, Supplement 1 (66), 2014

## ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF HYPOTHALAMIC PROLINE RICH POLYPEPTIDE GALARMIN (PRP-1) IN LPS-INDUCED ENDOTOXIC SHOCK

M.B. MATEVOSYAN, T.P. HARUTYUNYAN, A.A. DURGARYAN

*H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA  
mara\_matevosyan@hotmail.com*

В работе обобщены результаты исследований протекторного и противовоспалительного влияния богатого пролином полипептида - галармина при эндотоксическом шоке, индуцированном липополисахаридом (ЛПС) в условиях *in vivo*. Показано, что галармин значительно снижает уровни противовоспалительных цитокинов и повышает выживаемость зараженных животных.

*Богатые пролином полипептиды - галармин - липополисахарид - цитокины - выживаемость*

Ներկայացված են հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ գալարմինի (PRP-1) հակաբորբոքային ազդեցությունը LՊՍ-ով հարուցված էնդոտոքսիկ շոկի դեպքում *in vivo* պայմաններում:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ գալարմինը զգալիորեն նվազեցնում է ցիտոկինների հակաբորբոքային մակարդակները և բարձրացնում է վարակված կենդանիների կենսունակությունը:

*Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ - գալարմին - լիպոպոլիսախարիդ (LՊՍ) - ցիտոկիններ - կենսունակություն*

In the present work are summarized received data on protective and anti-inflammatory effect of hypothalamic proline rich polypeptide Galarmin during LPS-induced endotoxic shock. Received results indicate that the administration of Galarmin significantly increased the survival of infected mice and had a pronounced anti-inflammatory effect effect.

*Proline rich polypeptides - Galarmin - LPS - cytokines - survival*

The accumulated literature data on central nervous system (CNS) interaction with the immune system, expression of some cytokines and their receptors in cultures of human neurons, in astrocytes and microglia, testify to the existence of the brain immune system. Data received by A. Galoyan on the biosynthesis of a number of known interleukins and novel proline-rich polypeptides (PRPs) in neurosecretory neurons of the hypothalamus (*N. paraventricularis* and *N. supraopticus*) demonstrate that neuroendocrine nuclei of the hypothalamus are possibly a center of the neuro-endocrine-immune system of brain [1,2]. These peptides originate by proteolysis of the C-terminal glycoprotein neurophysin II and along with vasopressin and oxytocin, are transferred from the hypothalamus to the neurohypophysis by axonal transport [1]. It has been shown that one of them, PRP-1 or

galarmin (AGAPEPAEPAQPGVY), is a regulator of humoral and cellular immunity, thymocyte differentiation, and myelopoiesis. Studies have shown that galarmin stimulates the antigen-presenting function of macrophages, expression and release of human growth factor by transformed BALB/c mice fibroblasts, enhances spontaneous or fMLP- and PMA-induced oxidative burst, as well as the intracellular killing of *S. aureus* by human neutrophils and monocytes [3-7]. The antibacterial activity of galarmin was shown in vivo against different strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *Salmonella* (typhimurium, choleraesuis, typhi), *Escherichia coli*, *Cholerae suis*, *Shigella* (flexneri, sonnei), *Streptococcus pneumoniae*, etc. [8]. In our previous experiments, we performed a systemic infection with *Staphylococcus aureus* and MRSA in mice showing a remarkable protective effect. Thus, galarmin injected intramuscularly (i.m.) 1 µg/mice 24 hours before infection could fully protect mice against lethal methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infection (100% of survival vs. 0% in the untreated group) when the peptide itself is devoid of direct inhibitory activity on bacterial [9]. However it was not clear whether galarmin protects from specific bacterial strain or its effects should be attributed to the capacity either to boost or modulate the immune system or to induce an environment that would prevent the deleterious effects of an overzealous inflammatory response. As one of the possible mechanisms of galarmin protective activity one can assume it's possible role to interfere with the exacerbated inflammatory response initiated by pathogen-associated molecular patterns. To better understand how galarmin can affect the cytokines and hormonal regulation during severe inflammatory background, we used LPS injected mouse model, which results in a dramatic increase in the expression of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, we demonstrate that the specific restoration of cytokines and cortisol levels in mice by galarmin leads to the restoration of normal phenotype. Our data demonstrate for the first time that galarmin promotes the regulation of LPS induced inflammation by controlling the expression of main inflammatory cytokines and cortisol.

#### Material and Methods.

**Animals used.** Young (4- to 5-week-old) male pathogen-free BALB/c mice with body weight of 16-18 g, received from the Institute animal house were used at the study. Animal housing and care were performed according to the US National Research Council's "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

**Proline-rich polypeptides:** 24h before LPS treatment mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 1 µg/mouse of galarmin (AGAPEPAEPAQPGVY) in a volume of 200 µl of pyrogen-free saline or with equal amount of saline vehicle alone (as a control). Prior to the testing *in vivo*, peptides were ensured for not contamination with lipopolysaccharide (LPS) using highly sensitive the Limulus amoebocyte lysate test (LAL-test).

**LPS-induced inflammation and lethality.** LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich) was diluted in pyrogen-free saline and given 5 mg/kg i.p. Cumulative mortality was then monitored over the next 7 days. All surviving animals were euthanized by cervical dislocation.

**Levels of cytokines and corticosterone in serum.** Blood samples were collected by cardiac puncture 2h after the LPS challenge. The blood was allowed to clot at 4°C for 2h and centrifuged to obtain serum samples that were stored in aliquots at -20°C before assaying them for cytokines and cortisol. Quantification of the mouse serum levels of IL-1, tumor necrosis factor- alpha (TNF-α), cortisol and immunoglobulins of the main classes (IgA, IgM, IgG) were determined using enzyme-linked immunosorbent assays kits (ELISA) per the manufacturer's instructions (Vector Best, Russia), and the wells were read at 450 nm on an optical plate reader StatFax 303plus. Standard curves were prepared using purified cytokine standards. Each experimental sample was run in duplicate.

**Statistics.** The data are expressed as the mean with the standard error of the mean. The statistical significances were determined using SPSS 11.0 software (SPSS, USA). Comparative analysis was performed using parametric univariate analysis of variance (ANOVA), and multiple

comparisons were performed using Scheffé's test for linear contrasts and paired Student's t-test. The level of significance was defined at  $P \leq 0.05$ .

### Results.

The results shown in Fig. 1 reflect the lethality of LPS in mice challenged with lethal dose of LPS. LPS-treated mice were pre-injected with galarmin, and the number of surviving mice was determined. Galarmin significantly enhanced the survival of mice, and had a pronounced protective effect during the period of development of the inflammation that is reflected in weight loss recovery. As shown in Fig. 1a, the weight loss was weakly more severe among LPS treated mice than in galarmin group and total recovery was obtained within one week. In particular, when mice were injected with 5 mg/kg LD<sub>100</sub> of LPS, survival in galarmin-treated mice was 60%, whereas no survivors were observed among control mice given vehicle alone (Fig. 1b).

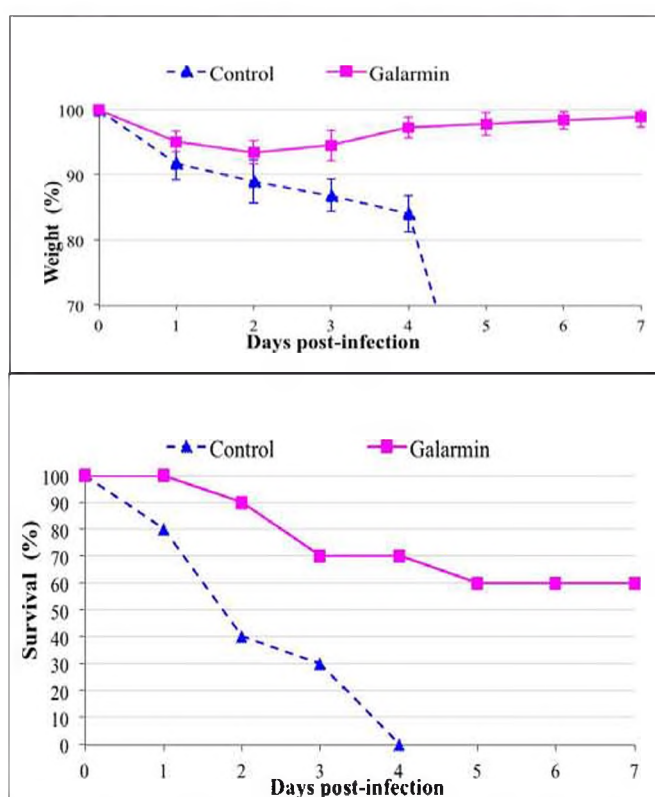
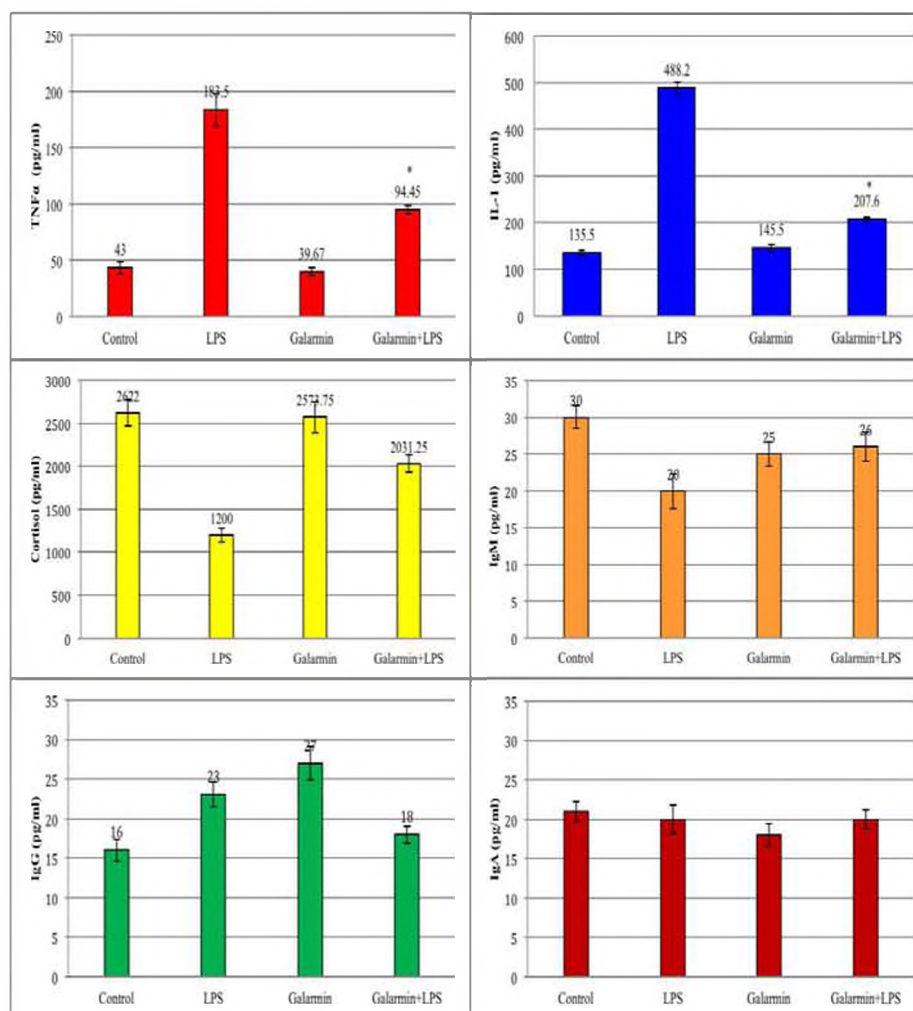


Fig. 1. Survey of outcome of LPS-treated mice (5 mg/kg i.p.) and weight loss without (control) and with galarmin pre-treatment (1 µg/mouse) 24h before LPS challenge. Data is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 10/group).

In agreement with our experimental model, we analyzed mice one day galarmin treatment for the serum level of pro-inflammatory cytokines, immunoglobulins and cortisol levels. Levels in serum of TNF- $\alpha$  and IL-1 increased after the administration of LPS. However, our data showed that at 2h after LPS treatment, the standard time of most research studies [10], the level of pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF $\alpha$ ) was significantly lower following galarmin treatment, and the apparent level of cortisol was considerably higher than that of galarmin-untreated groups, while there was no any changes in immunoglobulins levels. Two hours after LPS injection, the serum showed a

significant increase in TNF $\alpha$  in the positive control group (183.8 pg/ml) group when compared with the negative and Galarmin+LPS groups (43 pg/ml and 94.45 pg/ml, respectively,  $P \leq 0.05$ ) (Fig. 2a). These changes were similar and even more expressed in IL-1 with high increase over the negative control following LPS treatment (488.2 pg/ml vs 135.5 pg/ml) and up to two-fold normalization to the control level in Galarmin-LPS group (207.6 pg/ml) (Fig. 2b). The expression of cortisol in the LPS group (1200 pg/ml) was significantly lower than in the groups (control, Galarmin and Galarmin+LPS: 2622 pg/ml, 2573.75 pg/ml and 2031.25 pg/ml respectively) (Fig. 2c). The levels of IgG, IgM and IgA were not significantly different among the experimental groups (Fig. 2d-f).



**Fig.2.** Levels in sera of TNF $\alpha$  (a), IL-1 (b), cortisol (c), and immunoglobulins (d-f) in each group 2h after administration of LPS (5 mg/kg) and galarmin (1 µg/mouse) to BALB/c mice \* $P \leq 0.05$ , n=10.

### Discussion.

The effect of hypothalamic proline-rich polypeptide galarmin against LPS induced inflammation in BALB/c mice was investigated. Mice were treated with galarmin and were then injected with LPS. The administration of galarmin significantly increased the

survival of infected mice and had a pronounced protective effect during the period of development of the inflammation. The level of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 were significantly lower following PRP-1 treatment while there was no changes in the main classes immunoglobulin's serum levels (IgG, IgM, IgA). Although galarmin favored glucocorticoid (cortisol) production that could offer an explanation for such an observation associated better control of the inflammatory response involved in anti-inflammatory background of galarmin. As one of the possible mechanisms of galarmin protective activity following data showed in this paper one can assume it's possible role to interfere with the exacerbated inflammatory response initiated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such LPS.

Our results indicate increase in cortisol levels following galarmin challenge. It has been reported that glucocorticoids inhibit TNF production *in vitro* and *in vivo* if administered prior to LPS stimulation but are rather less effective when applied after the induction of TNF synthesis [10, 11]. It is possible that the regulation of cortisol and possibly other corticosteroids is the underlying mechanism of galarmin protective effects as a regulator of immune and inflammatory reactions. It is quite likely that the cytokine network is irreversibly engaged in producing a state of shock just after stimulation with LPS, while the down-regulating factors, released during these processes, may not efficiently control cytokine generation in the acute phase and galarmin plays it beneficial role by triggering the compensatory mechanisms. These observations are in agreement with our previous reports of the galarmin-related increase in IL-10 production [9], an important anti-inflammatory cytokines.

In conclusion, the major finding of this study is the apparent protective effect of hypothalamic proline rich peptide galarmin against the lethal effect of LPS. Our results indicate the ability of galarmin to bring about rapid recovery of immunoactivated state. Galarmin may be a potential useful adjunct in clinical medicine for the protection of autoimmune and immunocompromised hosts, however the exact molecular mechanisms of galarmin action have to be further investigated.

#### Acknowledgments.

This research has been undertaken with financial support of ANSEF grant microbio #3244.

#### REFERENCES.

1. Galoyan A.A. Concepts of Neuroendocrine Cardiology and Neuroendocrine Immunology, Chemistry and Biology of Signal Molecules. *Neurochem. Res* 35(2): 2001-2027, 2010.
2. Galoyan A. The brain immune system: chemistry and biology of the signal molecules. In: Lajtha A (ed.), Galoyan AA, Besedovsky HO (eds) *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, v. Neuroimmunology, 3rd ed. Springer, New York, 2008.
3. Galoyan A.A., Korochkin L.I., Rybalkina E.J., et al. Hypothalamic proline-rich polypeptide enhances bone marrow colony-forming cell proliferation and stromal progenitor cell differentiation. *Cell Transplantation* 17(9): 1061-1066, 2008.
4. Galoyan A.A., Aprikyan V.S. A new hypothalamic polypeptide is a regulator of myelopoiesis. *Neurochem Res* 27(4): 305-312, 2002.
5. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. New hypothalamic peptides in regulation of thymocytes differentiation. *Neurokhimiya RAS & NAS RA* 19: 227-231, 2002.
6. Bezirganyan KB, Davtyan TK, Galoyan AA [Hypothalamic Proline Rich Polypeptide Regulates Hematopoiesis](#). *Neurochem. Res* 35(6): 917-924, 2010.

7. *Davtyan T.K., Manukyan H.A., Mkrtchyan N.R., Avetisyan S.A., Galoyan A.A.* Hypothalamic Proline-Rich polypeptide is a regulator of oxidative burst in human neutrophils and monocytes. *Neuroimmunomodulation* 12: 270-284, 2005.
8. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.
9. *Durgaryan A.A., Matevosyan M.B., Seferyan T.Y., Sargsyan M.A., Grigoryan S.L., Galoian K.A., Galoyan A.A.* The protective and immunomodulatory effects of hypothalamic proline-rich polypeptide galamin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 2153-2165, 2012.
10. *Shemi D., Azab A.N., Kaplanski J.* Time-dependent effect of LPS on PGE2 and TNF- $\alpha$  production by rat glial brain culture: influence of COX and cytokine inhibitors. *J Endotoxin Res* 6(5): 377-81, 2000.
11. *Håkansson H.F., Smailagic A., Brunmark C., Miller-Larsson A., Lal H.* Altered lung function relates to inflammation in an acute LPS mouse model. *Pulm Pharmacol Ther.* 25(5): 399-406, 2012.
12. *DiDonato J.A., Mercurio F., Karin M.* NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev.* 246(1): 379-400, 2012.
13. *Schmidt-Ullrich R., Me'met J., Lilienbaum A., Feuillard J, Raphael M, Israel A* NF- $\kappa$ B activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* 122: 2117-2128, 1996.
14. *Black P.H.* Immune system-central nervous system interactions: effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 7-12. 1994.
15. *Reichlin S.* Neuroendocrine-immune interactions. *N. Engl. J. Med.* 329: 1246-1253, 1993.
16. *Parant M., Contel C.L., Parant F., Chedid L.* Influence of endogenous glucocorticoid on endotoxin-induced production of circulating TNF- $\alpha$ . *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 265-271, 1991.
17. *Miller-Larsson A., Runström A., Brattsand R.* Adrenalectomy Permits a late, local TNF- $\alpha$  release in LPS-challenged rat airways. *Eur Respir J.* 13(6): 1310-7, 1999.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, հավելված 1 (66), 2014

## ՍԱԼՄՈՆԵԼՈԶԻ ԺԱՄԱՆԱԿ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻ ԽԱՆՏՈՒՄՆԵՐԸ ՇՃԱՏԵՍԱԿ ՍԳԵՑԻՖԻԿ ԵՆ

Մ.Ս. ՄԿՐՏՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ  
mkhitarmkrtchyan@gmail.com

Դասական մանրէաբանական մեթոդների միջոցով, օգտագործելով սելեկտիվ միջավայրեր ուսումնասիրվել է Հայաստանում տարածված *Salmonella typhimurium* և *S. enteritidis* շճատեսակներով հարուցված հիվանդների աղիքային միկրոֆլորայի որակական և քանակական կազմը: Առաջված արդյունքներից բխում է, որ երկու տարբեր շճատեսակներով հարուցված հիվանդների մոտ ի համեմատ առողջ ստուգիչների առկա է խորը դիսբիոզ, որի ընթացքում դիտվել է օգտակար բակտերիաների թվի կտրուկ նվազում և պաթոգենների քանակի խիստ ավելացում: Կիրառվել է դիսկրիմինատ ֆունկցիոնալ անալիզ, որի կախյալ փոփոխականներ էին հանդիսանում հետազոտվողների 4 խմբեր, իսկ պրեդիկտորներն են եղել վիճակագրորեն հավաստի նորմայից շեղումներով դիսբիոզի աստիճանը և 7 բակտերիալ խմբեր: ԴԱ-ի արդյունքները վկայում են դիսբիոզի սպեցիֆիկության մասին կախված ինչպես շճատեսակից, այնպես էլ տարիքից:

*Salmonella* - սալմոնելոզ - միկրոֆլորա - դիսբիոզ - շճատեսակ

Исследован количественный и качественный состав микрофлоры больных сальмонеллезом, вызванным распространенными в Армении серотипами *Salmonella Typhimurium* и *S. Enteritidis*, методом классической микробиологии, с использованием селективных сред. По сравнению с контролем, у больных, инфицированных двумя разными серотипами, наблюдается глубокий дисбиоз, во время которого резко уменьшается число полезных бактерий и увеличивается количество патогенов. Проводился дискриминантный функциональный анализ, где зависимыми переменными были 4 группы обследованных, а предикторами являлись статистически значимые отклонения степени дисбиоза от нормы и 7 бактериальных групп. Результаты ДА свидетельствуют о специфичности дисбиоза, в зависимости как от серотипа, так и от возраста.

*Salmonella* - сальмонеллез - микрофлора - дисбиоз - серотип

With the use of classical microbiological methods and selective media were investigated quantitative and qualitative composition of gut microflora of patients infected with salmonellosis, caused by two serotypes prevalent in Armenia, *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. The obtained data showed that in patients infected with two different serotypes, occurs deep dysbiosis, during which took place sharp decreasing of the number of beneficial bacteria and increasing of pathogens, compared to control. Discriminate functional analysis was performed, where the dependent variables were four investigated groups and the predictors- statistically significant deviated from norm degree of dysbiosis and 7 bacterial groups. The results of DA indicate the specificity of dysbiosis, depending both on the serotype and age.



Մարդու նորմալ միկրոֆլորայի ցանկացած տեսակի քանակական և որակական փոփոխությունները առաջացնում են դիսբիոզ: Դիսբակտերիոզի առաջացման պատճառ կարող են հանդիսանալ՝ հակաբիոտիկները, քիմիոթերապիան, ծանր ինֆեկցիաները, ծանր սոմատիկ հիվանդությունները և այլ վնասակար ազդեցությունները:

Միկրոէկոլոգիական ՔիտոտաններըՄՆ հանդիսանում են մի շարք պաթոլոգիաների պաթոգենետիկ գործոններից մեկը [8, 9]:

Աղետամոլոքային տրակտի ինֆեկցիաների դեմ կոմենսալ միկրոբիոտայի և իմունային համակարգի համալիր ազդեցության մեխանիզմները դեռևս լիարժեք պարզաբանված չեն [5]:

Աղիքային ինֆեկցիաները, այդ թվում սալմոնելոզները, բազմագործոնային պրոցես են, որոնք ներառում են պաթոգենի բնութագիրը, տիրոջ աղիքային միկրոֆլորայի կազմը, իմունային կարգավիճակը և շրջակա միջավայրի գործոնները [7]:

Աղիքային ինֆեկցիայի ժամանակ զարգացող դիսբակտերիոզն ավելի է ծանրացնում հիվանդությունը և նպաստում է պրոցեսի քրոնիզացմանը, նվազեցնում է կիրառվող բուժման արդյունավետությունը և հիմք է ծառայում բազմաթիվ քրոնիկական հիվանդությունների զարգացման համար:

Մեր աշխատանքներում ցույց է տրվել, որ Հայաստանում *Salmonella enterica* ենթատեսակի երկու ամենատարածված շճատեսակներն են *S. enteritidis* և *S. typhimurium*, որոնք առավել հաճախակի պատճառ են հանդիսանում մարդկանց սուր գաստրոէնտերիտների առաջացմանը [4]:

Ելնելով վերը նշվածներից, աշխատանքի հիմնական նպատակն է ուսումնասիրել տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի դեպքում միկրոֆլորայի որակական և քանակական խախտումները, ինչը կնպաստի արդյունավետ բուժման ընտրությանը:

#### Նյութ և մեթոդ:

Հետազոտվել են "Նորք" ինֆեկցիոն կլինիկական հիվանդանոցի կողմից տրամադրված 2013 թվականին գրանցված սալմոնելոզի սուր փուլում գտնվող 47 հիվանդների կղանքի նմուշներ՝ 16 *S. typhimurium* և 31 *S. enteritidis*, և 14 առողջ դուրսեր: Հետազոտությունները կատարվել են երկու տարիքային խմբերում. առաջինը՝ մինչև 4 տարեկան և երկրորդը՝ 4-ից մեծ:

Սալմոնելոզ ախտահիշող հաստատված է կլինիկական պատկերի և լաբորատոր ուսումնասիրման մեթոդների հիման վրա: Սալմոնելոզը ախտորոշվել է մանրէաբանական մեթոդով, օգտագործելով սելեկտիվ ագարներ, ինչպես նաև կենսաքիմիական և սերոլոգիական թեստեր անցկացնելով, Ուայտ-Կաուֆմանի ստանդարտի օգտագործմամբ:

Կուլտիվացվող բակտերիալ խմբերի որակա-քանակական կազմի որոշման համար կիրառվել են հետևյալ սելեկտիվ միջավայրերը. Էնդո ագար, բիսմութ-սուլֆիդ, ՍՇԱ (սալմոնելա-շիգելային ագար), ԼԱԱ (լեդի-ադային ագար), արյան ագար, Սաբուրո ագար: Ցանքսի արդյունքները դիտարկվել են 24-72 ժ հետո:

Ստացված տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է, օգտագործելով "GraphPad QuickCalcs: t test calculator" (GraphPad Software Inc., ԱՄՆ) ծրագրային փաթեթը և "SPSS Statistics 19" (SPSS Inc., Chicago, IL, ԱՄՆ) ծրագրի օգտագործմամբ իրականացվել է դիսկրիմինատ ֆունկցիոնալ անալիզ: Վիճակագրորեն հավաստի են համարվել այն արդյունքները, որոնց դեպքում  $p \leq 0,05$ :

#### Արդյունքներ և քննարկում:

Աղիքային միկրոֆլորայի հետազոտությունների արդյունքում հայտնաբերվել են խորը շեղումներ սալմոնելոզով հիվանդների մոտ՝ հարուցված տարբեր շճատեսակներով:

Ներկայումս պայմանականորեն առանձնացնում են աղիքային դիսբիոզի 4 աստիճան.

Առաջին՝ լատենտ, կոմպենսացված ձև. ընթանում է առանց պաթոլոգիական փոփոխությունների: Երկրորդ՝ սուբկոմպենսացված ձև. բնութագրվում է աղիքների լուրջ բորբոքումներով: *E. coli*-ի, բիֆիդոբակտերիաների քանակը նվազում է, իսկ



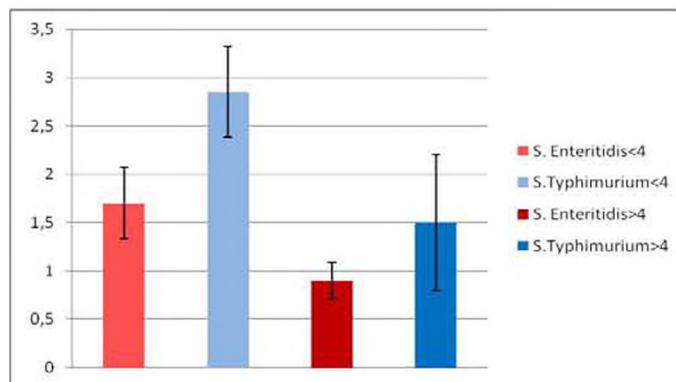
պայմանական պաթոգենների քանակն ավելանում է: Երրորդ՝ խորը դիսբիոզ. *E. coli*-ի, բիֆիդո և լակտոբակտերիաների քանակի զգալի նվազում, կլինիկական պատկերը բարդանում է, ինչպես նաև աճում է դեկոմպենսացիայի աստիճանը: Չորրորդ՝ բիֆիդո և լակտոբակտերիաները գրեթե բացակայում են, ինչպես նաև *E. coli*-ին, տեղի է ունենում աղիքային էպիթելի դեստրուկցիա, կարող է զարգանալ բակտերեմիա և սեպսիս, ի հայտ են գալիս ինֆեկցիայի նոր օջախներ [1, 3]:

Այս աշխատանքում ուսումնասիրվել է *S. enteritidis* և *S. typhimurium* հարուցված սալմոնելոզի սուր փուլով հիվանդների միկրոբիոտայի քանակակն և որակական կազմը: Բացահայտվել է խորը դիսբիոզ հիմնականում արտահայտված բիֆիդոբակտերիաների, լակտոբակտերիաների և աղիքային ցուպիկի կտրուկ նվազեցմամբ, ինչպես նաև լակտոզ բացասական էնտերոկոկների, *Candida* ցեղի սկզբի և աղիքային ֆլորայի պաթոգեն բակտերիաների քանակական շեղումներով (աղ. 1):

**Սղյուակ 1.** Միկրոֆլորայի ներկայացուցիչների տոկոսային փոփոխությունները տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի դեպքում

| Միկրոֆլորա |                                                          | <i>S. typhimurium</i><br>Սուր ընթացք,<br>% | <i>S. enteritidis</i><br>Սուր ընթացք, % |
|------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1          | Աղիքային խմբի ախտածին մանրէներ                           | 70                                         | 27.5                                    |
| 2          | Աղիքային ցուպիկի ընդհանուր քանակը                        | 53.3                                       | 42.5                                    |
| 3          | Թույլ ֆերմենտային հատկություններով աղիքային ցուպիկ       | 0                                          | 7.5                                     |
| 4          | Լակտոզբացասական էնտերոբակտերիաներ                        | 56.6                                       | 22.5                                    |
| 5          | Յեմոլիզող աղիքային ցուպիկ                                | 30                                         | 22.5                                    |
| 6          | Կոկային ձևերի տոկոսը ընդհանուր մանրէների քանակության մեջ | 43.3                                       | 47.5                                    |
| 7          | Յեմոլիզող ստաֆիլոկոկի տոկոսը կոկային ձևերի մեջ           | 0                                          | 0                                       |
| 8          | Բիֆիդոբակտերիաներ                                        | 76.7                                       | 62.5                                    |
| 9          | Լակտոբակտերիաներ                                         | 66.7                                       | 75                                      |
| 10         | Էնտերոկոկեր                                              | 26.7                                       | 30                                      |
| 11         | Պրոտեուս խմբի մանրէներ                                   | 0                                          | 0                                       |
| 12         | Ոսկեգույն ստաֆիլոկոկ                                     | 0                                          | 0                                       |
| 13         | Կանդիդա խմբի սկզբ                                        | 33.3                                       | 30                                      |
| 14         | Անաերոբ կոկեր                                            | 0                                          | 0                                       |
| 15         | Կլոստրիդիաներ                                            | 0                                          | 0                                       |

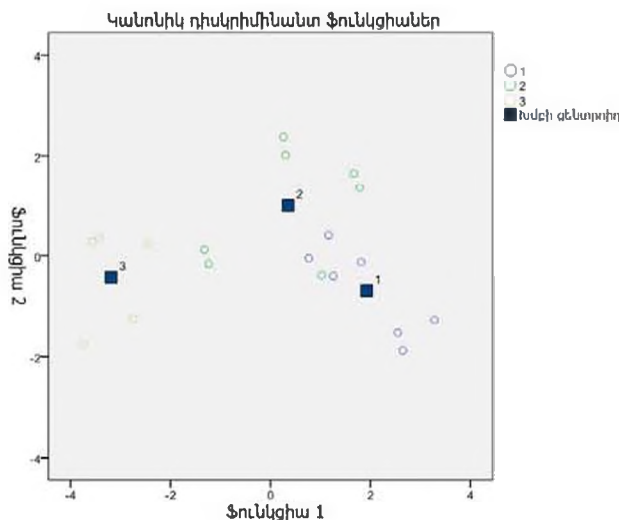
Իրականացվել են ստացված տվյալներին ինչպես ներխմբային, այնպես էլ միջխմբային համեմատական վերլուծություններ: Խախտումների քանակը, ըստ դիսբիոզի աստիճանի, *S. typhimurium* հարուցիչի դեպքում վիճակագրորեն հավաստի 2 անգամ ավելի բարձր է ի համեմատ *S. enteritidis*-ի (միջինը 2,2 և 1,2 համապատասխանաբար,  $p=0.02$ ): Առավել արտահայտված է դիսբիոզը փոքր տարիքային խմբերում, ընդ որում *S. typhimurium* և *S. enteritidis* հարուցիչների միջև միջինը 2.9 և 1.6,  $p=0.03$ : Ներխմբային վերլուծության ժամանակ բացահայտվել է դիսբիոզի աստիճանի վիճակագրորեն հավաստի տարբերություն փոքր և մեծ տարիքային խմբերում, *S. enteritidis* հարուցիչի դեպքում (միջինը 1.7 և 0.9 ,  $p=0.05$ ) (Նկ. 1):



**Նկ. 1. Դիսբիոզի կախվածությունը շճատեսակից և տարիքից**

*S. enteritidis* < 4 և *S. typhimurium* < 4՝ 1-ին խումբ, *S. enteritidis* > 4 *S. typhimurium* > 4՝ 2-րդ խումբ:

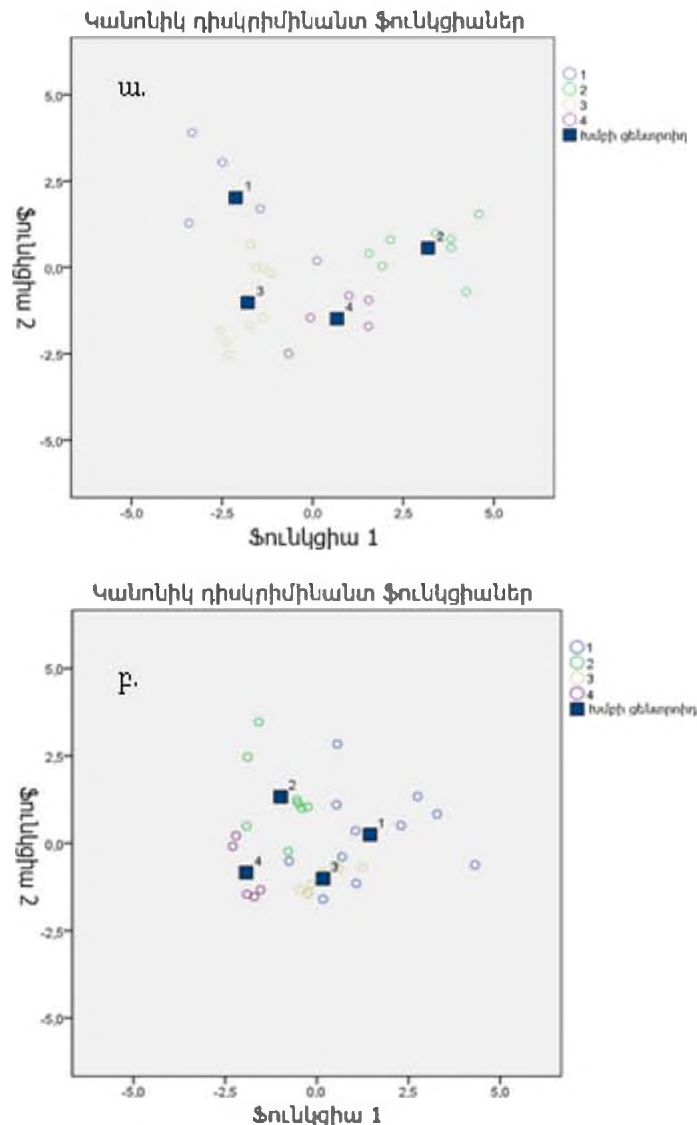
Ջետագայում տվյալները ենթարկվել են բազմաչափ վիճակագրական վերլուծության սմուլների բաշխումը որոշելու համար: Կիրառվել է դիսկրիմինանտ անալիզ, որի կախյալ փոփոխականներ էին հանդիսանում հետազոտվողների 4 խմբեր, իսկ պրեդիկտորներն են եղել նորմայից շեղումներով դիսբիոզի աստիճանը և 7 բակտերիալ խմբեր՝ ադիքային ցուպիկ, բիֆիդոբակտերիաներ, լակտոբակտերիաներ, լակտոզ բացասական էստերոկոկներ, կանդիդա ցեղի սնկեր և ադիքային ֆլորայի պաթոգեն բակտերիաներ: ԴԱ-ի արդյունքները ապացուցեցին դիսբիոզի սպեցիֆիկությունը կախված ինչպես շճատեսակից (նկար 2), այնպես էլ տարիքից (նկ. 3 ա. բ): ԴԱ-ի վիճակագրորեն հավաստիությունը հիմնված է Ուիլկոքսի լյամբդա թեստի վրա:



**Նկ. 2. *S. enteritidis* և *S. typhimurium* հարուցվածների առաջին տարիքային խմբի ԴԱ**

Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 84,2, Ուիլկոքսի լյամբդան՝

0,1 (1- *S. Enteritidis*, 2- *S. typhimurium*, 3- դոնոր)



Նկ. 3. *S. typhimurium* (ա.) և *S. enteritidis* (բ.) հարուցված երկու տարիքային խմբերի դիսքրիմինանտ

ա. Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 89,3, Ուիլկոքսի լյամբդան՝ 0,031 (1- *S. typhimurium* 4 տարեկանից մեծ, 2- *S. typhimurium*՝ 4-ից փոքր, 3- դոնոր՝ 4-ից մեծ, 4- դոնոր՝ 4-ից փոքր)  
 բ. Դասակարգման ճշտության տոկոսը՝ 82, Ուիլկոքսի լյամբդան՝ 0,1 (1- *S. enteritidis* 4 տարեկանից մեծ, 2- *S. enteritidis*՝ 4-ից փոքր, 3- դոնոր՝ 4-ից մեծ, 4- դոնոր՝ 4-ից փոքր):

Ստացված տվյալները վկայում են, որ հետազոտված սալմոնելոզով հիվանդների միկրոբիոտան գերընշված է, ի դեմ պայմանական պաթոգեն մանրէների աճի մեծացմանը: Աղիքային ցուպիկի նվազումը արգելք է հանդիսանում պայմանական պաթոգեն մանրէների արտահանմանը աղիներից: *E. coli*-ի, բիֆիդո և լակտոբակտերիաների քանակի ճնշվածությունը, ընդհուպ մինչև բացակայությունը, հանգեցնում է նորմալ միկրոֆլորայի ապակայունացմանը և նպաստում է օտար մանրէների բնակեցմանը: Բիֆիդոբակտերիայի դեֆիցիտը հանդիսանում է աղիքային խանգարումների պաթոգեն ֆակտոր: Լակտոբակտերիաների բացակայությունը նվազեցնում է իմուն պատասխանի

արդյունավետությունը: Հեմոլիզող բակտերիաների առկայությունը առաջացնում է ալերգիկ պրոբլեմներ: Լակտոզ բացասական բակտերիաների առկայությունը բերում է դիսպեպտիկ երևույթների: Երկու շճատեսակի վարակի դեպքում զարգանում է կանդիդոզ (աղյ. 1):

Ախտածնից ազատվելու գործում միկրոբիոտան վճռական դեր է խաղում: Համաձայն Blaser et al., միկրոբիոտայի տևական առկայությունը բերում է անհրաժեշտ տեր-միկրոբ փոխհարաբերությունների հավասարակշռությանը, սակայն այն միշտ էլ, որ կայուն է [6]:

Աղիքային միկրոբիոտայի պաշտպանական դերը ցույց է տրված *Vibrio cholerae*, պաթոգեն *Escherichia coli* շտամի, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile* ինֆեկցիաների դեպքում [9]:

Հայտնի է, որ օգտակար բակտերիաների քանակի փոփոխությունը հանգեցնում է իմունոլոգիական բալանսի և հոմեոստազի խախտման [8, 10]:

Նախորդ աշխատանքներում ցույց էր տրվել, որ սալմոնելոզի ժամանակ բորբոքային պատասխանը շճատեսակ սպեցիֆիկ է [2]: Ներկա աշխատանքի արդյունքները նույնպես վկայում են սալմոնելոզի տեր-միկրոբ փոխազդեցության շճատեսակ սպեցիֆիկությունը: Չնայած *Salmonella* շճատեսակները գենետիկորեն շատ մոտ են, սակայն ինֆեկցիային տիրոջ պատասխանի և նրանց պաթոգեն պոտենցիալների միջև գոյություն ունեն զգալի տարբերություններ: Հետագա ուսումնասիրությունները անհրաժեշտ են ինֆեկցիայի սալմոնելաների տարբեր շճատեսակների գենոմում տարբեր կերպ արտահայտված գեների դերը պարզելու համար:

Այսպիսով, հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ *Salmonella* վարակների տեր-միկրոբ փոխազդեցությունները տարբեր են: Տվյալները ցույց են տալիս, որ սպեցիֆիկությունը կախված է ինչպես շճատեսակից, այնպես էլ տարիքից:

## ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Бондаренко В.М., Боев Б.В., Лыкова Е.А., Воробьев А.А. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта, Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 1, 66-70; 1998.
2. Кцоян Ж.А., Казарян К.А., Мартirosян А.А., Мнацаканян А.А., Аракелова К.А., Геворгян З.У., Татян М.В., Оганисян А.И., Седракян А.М., Захарян М.К., Аракелян А.А., Бояджян А.С., Аминов Р.И. Профиль провоспалительного ответа при сальмонеллозе зависит от серотипа возбудителя, Цитокины и воспаление, 12; 1-2; 131-136; 2013.
3. Светлова И.О., Солдатова Г.С., Поспелова М.И. Микробиоценоз кишечника. Современные представления о норме и патологии. Принципы коррекции нарушений, Методические рекомендации для врачей, Новосибирск, 1998.
4. Седракян А.М., Геворгян З.У., Аракелова К.А., Кцоян Ж.А. Исследование кишечной микрофлоры больных сальмонеллозом, ДАН РА, 1; 84-91; 2008.
5. Barman M., Unold D., Shifley K., Amir E., Hung K., Bos N., Salzman N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract, *Infect. Immun.*; 76; 3; 907-915; 2008.
6. Blaser M.J., Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts; *Nature*, 449, 18; 843-849; 2007.
7. Gordon M.A. Salmonella infections in immunocompromised adults; *J Infect*; 56; 6; 413-422; 2008.
8. Littman D.R., Pamer E.G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses; *Cell Host & Microbe*, 10, 4; 311-323; 2012.
9. Stecher B., Hardt W.D. The role of microbiota in infectious disease; *Trends Microbiol*, 16; 3; 107-114; 2008.
10. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., W.M. de Vos High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota; *Gut*; 57; 11; 1605-1615; 2008.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, Հավելված 1 (66), 2014

## ԱՐՅԱՆ ԾԻՃՈՒԿԻ ՊԱՇՏՊԱՆՆԻՉ ՀԱՏԿՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*-Ի ՆԿԱՏԱՐՄ

Մ.Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ս.Լ.ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան  
sargsyan.1960@mail.ru

Հակակոստրիդիոզային վակցինայի (պատվաստանյութ) և գալարմինի համատեղ ներարկումը նպաստում է օրգանիզմի իմունաիրավասու բջիջների ակտիվության բարձրացմանը՝ մասնավորապես IgG, IgA, IgM քանակի ավելացումով: Նշված իմունագլոբուլինների քանակի ավելացումը դիտվում է վակցինայի և գալարմինի առանձին և համատեղ օգտագործման դեպքում: Միայն վակցինացման արդյունքում ճագարների, ծովախոզուկների և մկների արյան շիճուկում IgG-ի քանակը համապատասխանաբար կազմում է 4.03; 2.67 և 1.69գ/լ: Գալարմինի և վակցինայի համատեղ օգտագործման դեպքում կենդանիների արյան շիճուկում նշված գլոբուլինների քանակը համապատասխանաբար կազմում է 6.02; 4.85; և 2.12գ/լ:

*Մանրէ - արյան շիճուկ - ինֆեկցիա - գալարմին - Clostridium perfringens*

Совместная инъекция противоклостридиозной вакцины и галармина стимулирует активацию иммунокомпетентных клеток в организме животного. Это обусловлено увеличением количества иммунокомпетентных клеток, ответственных за синтез иммуноглобулинов G, A и M, что наблюдалось на фоне как раздельного, так и совместного применения вакцины и галармина. Только в результате вакцинации содержание IgG в сыворотке крови кроликов, морских свинок и мышей составило соответственно 4.03, 2.67 и 1.62 г/л, при совместном же применении вакцины и галармина содержание того же показателя в сыворотке крови подопытных животных составило соответственно 6.02, 4.85 и 2.12 г/л.

*Бактерия - сыворотка крови - инфекция - галармин - Clostridium perfringens*

The joint injection of vaccine against *Clostridium perfringens* and galarmin promote activation of the immune cells of blood. This is due to the increase in the number of immune cells responsible for synthesis of immunoglobulins G, A and M. Increase of these antibodies was observed during of both individual and joint use of vaccines and galarmin. Only as a result of vaccination of IgG in the serum of rabbits, Guinea pigs and mice respectively was 4.03, 2.67 and 1.62 g/l, while sharing the same application of the vaccine and galarmin content of the same indicator in the blood serum of experimental animals was respectively, 6.02; 4.85 and 2.12 g/l.

*Bacteria - blood serum - infection - galarmin - Clostridium perfringens*

ինֆեկցիոն հիվանդությունների համաճարակաբանական դասակարգման համակարգում առանձնահատուկ նշանակություն ունի շիճուկաբանական ախտորոշման եղանակը: Արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկության բացահայտումը միաժամանակ համարվում է կենդանիների պասիվ իմունացման արդյունավետության ուսումնասիրման ցուցանիշ:

Աշխատանքի նպատակն է գալարմիտով մշակված ճագարների, ծովախոզուկների և մկների իմունացնել ճագարների ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիայի գլիցերինային պատվաստանյութերով և պատվաստված կենդանիներից ստանալ իմուն շիճուկներ և որոշել նրանց պաշտպանիչ ակտիվությունը:

#### Նյութ և մեթոդ:

Ֆետագոտական աշխատանքների կատարման համար օգտագործվել են 3.2-3.5 կգ կենդանի զանգվածով 72 գլուխ առողջ ճագարներ, 450-550գր կենդանի զանգված ունեցող 72 գլուխ ծովախոզուկներ և 72 գլուխ 18-20 գր սպիտակ մկներ, որոնք համաժամանության սկզբունքով բաժանվել են 3 խմբերի և 15 ենթախմբերի յուրաքանչյուրում՝ 12-ական կենդանի:

Ճագարների ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիայի նկատմամբ վակցինացվել են (պատվաստվել) 12-ական գլուխ ճագարներ, ծովախոզուկներ, մկներ և նույն քանակությամբ կենդանիներ օգտագործվել են որպես ստուգիչներ: Արյան շիճուկի պրեցիտիվ (պաշտպանիչ) հատկությունը որոշվել է նույնպես 12-ական գլուխ ճագարների, ծովախոզուկների և մկների վրա: Մեր կողմից ստացված շիճուկի պաշտպանիչ ակտիվության որոշման ստուգիչ է համարվել Կուրսկի կենսաֆարիկայից ստացված *Cl. perfringens*-ի A,C,D շիճուկաբանական տիպերի համախույժ շիճուկները, ինտակտ (տրմալ կենդանիների) արյան շիճուկները ֆիզիոլոգիական լուծույթը և *Cl. perfringens*-ի 24d մանրէական աճեցվածքը: Որոշվել է իմունազլուգուլինների և ընդհանուր սպիտակուցների քանակը վակցինացված և գալարմիտով մշակած կենդանիների արյան շիճուկում:

Որպես իմունայնթանի օգտագործվել է ակադեմիկոս Ա.Ա. Գալոյանի և աշխատակիցների կողմից սինթեզված արդիվնով հարուստ պոլիպեպտիդ (ՊՊՊ): Գալարմիսի օգտագործման չափաքանակը որոշվել է ճագարների, ծովախոզուկների և մկների վրա տիտրման միջոցով 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 100 մկգ: Բացահայտվել է, որ ճագարների համար գալարմիսի լավագույն չափաքանակը կազմում է 50 մկգ, ծովախոզուկներին՝ 20 մկգ, իսկ մկներինը՝ 5 մկգ: Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդը (ՊՊՊ) փորձնական կենդանիներին է ներարկվել պատվաստանյութը ներարկելուց 24 ժ առաջ, իսկ երկրորդ ներարկումը 72 ժ հետո: Նախքան կենդանիների պատվաստումը ջերմաչափման միջոցով որոշվել է կենդանիների օրգանիզմի ընդհանուր ջերմաստիճանը, այնուհետև կատարվել է պատվաստանյութի երկվակց ներարկում հակաձնի աճող չափաբաժիններով ներմկանային եղանակով (աղ. 1):

**Աղյուսակ 1.** Կենդանիների պատվաստումը ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիայի նկատմամբ, n=12

| h/h | Վակցինա (կենսապատրաստուկ)     | Կենդանիներ | Վակցինայի չափաքանակ, մլ |         |
|-----|-------------------------------|------------|-------------------------|---------|
|     |                               |            | առաջին                  | երկրորդ |
| 2   | ճագարների ինֆեկցիոն           | ճագար      | 0,5                     | 1,0     |
| 3   | էնտերոտոքսեմիայի գլիցերինային | ծովախոզուկ | 0,5                     | 0,8     |
| 4   | պատվաստանյութ                 | մկ         | 0,3                     | 0,6     |

Կենդանիների երկվակց պատվաստումը կատարվել է 2 շաբաթ ընդմիջումով, ընդ որում առաջինը կատարվել է միայն պատվաստանյութով, իսկ 2-րդը՝ նաև գալարմիտով: Արյան շիճուկի ստացման համար կենդանիների կրկնակի պատվաստումից 12 օր հետո կատարվել է արյունառություն կենդանիների ակնային եզրային երակից և սրտից:

Արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկությունը որոշվել է ճագարների, ծովախոզուկների և սպիտակ մկների վրա [1-5]: Շիճուկի ներակելուց 24 ժամ հետո փորձնական և ստուգիչ խմբերի մկները վարակվել են *Cl. perfringens*-ի A շիճուկաբանական տիպի մանրէական աճեցվածքի քամվածքի մախացու չափաբաժնով: *Cl. perfringens* -ի 100% մախացու չափաբաժինը ճագարների համար կազմել է 0,5մլ, ծովախոզուկներինը՝ 0,1-0,2մլ, իսկ մկներինը՝ 0,2-0,3մլ [6]:

#### Արդյունքներ և քննարկում:

Մեր հետազոտություններում դիտվել է իմունազլուգուլինների ( IgG; IgA; Ig;Mq/) քանակի ավելացում արյան շիճուկի ստացման բոլոր փուլերում

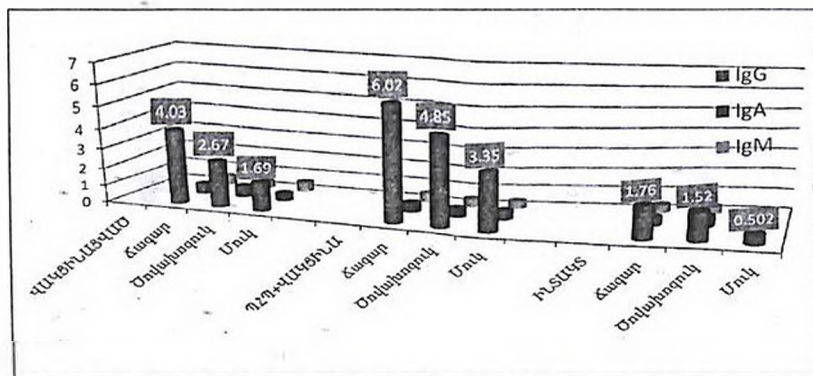
հետապատվաստային 15-Արդ օրվանից և իր առավելագույնին է հասել 60-րդ օրը, կազմելով 4.03; 2.67; 1.69 գ/լ համապատասխանաբար:

Ուշադրության է արժանի նույն ժամանակահատվածում IgG; IgA; IgM մակարդակի ավելացում գալարմիսի և վակցինայի համատեղ օգտագործման դեպքում, որը կազմում է 6.02; 4.85; 2.12գ/լ համապատասխանաբար (աղ. 2 և նկ. 1):

Աղյուսակ 2. ճագարների ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիայի պատվաստանյութով իմունացված և համատեղ գալարմիսով մշակված կենդանիների արյան շիճուկի ընդհանուր սպիտակուցի և սպիտակուցային ֆրակցիաների խտությունը, n=12

| Պատրաստուկներ                                             | Կենդանի     | Խումբ     | IgG գ/լ | IgA գ/լ | IgM գ/լ | Ընդհանուր սպիտակուց,գ/լ | Ալբումին, գ/լ | Գլոբուլին,գ/լ |
|-----------------------------------------------------------|-------------|-----------|---------|---------|---------|-------------------------|---------------|---------------|
| ճագարների ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիա պատվաստանյութ          | Ճագար       | Փորձնական | 4.03    | 0.60    | 0.53    | 73.9                    | 40.3          | 33.8          |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 1.76    | 0.44    | 0.41    | 61.2                    | 37.4          | 13.8          |
|                                                           | Ծովա-խոզուկ | Փորձնական | 2.67    | 0.69    | 0.39    | 62.6                    | 30.3          | 32.3          |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 1.52    | 0.54    | 0.35    | 56.6                    | 32.1          | 24.5          |
|                                                           | Մուկ        | Փորձնական | 1.69    | 0.45    | 0.56    | 61.2                    | 35.2          | 36.0          |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 0.502   | 0.46    | 0.38    | 0.56                    | 31.2          | 25.4          |
| ճագարների ինֆեկցիոն էնտերոտոքսեմիա պատվաստանյութ+գալարմիս | Ճագար       | Փորձնական | 6.02    | 0.55    | 0.50    | 70.0                    | 38.17         | 31.83         |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 1.76    | 0.44    | 0.41    | 61.2                    | 37.4          | 13.8          |
|                                                           | Ծովա-խոզուկ | Փորձնական | 4.85    | 0.52    | 0.44    | 64.1                    | 34.2          | 33.9          |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 1.52    | 0.54    | 0.35    | 56.6                    | 32.1          | 24.5          |
|                                                           | Մուկ        | Փորձնական | 2.12    | 0.48    | 0.44    | 65.2                    | 32.0          | 33.2          |
|                                                           |             | Ստուգիչ   | 0.502   | 0.46    | 0.38    | 0.56                    | 31.2          | 25.4          |

Աղ. 2-ի տվյալներից երևում է, որ փորձնական կենդանիների արյան շիճուկում IgG-ի մակարդակի ավելացում է դիտվել մոտ 3,42-5,3 գ/լ անզամ ստուգիչ խմբի կենդանիների համեմատությամբ:



Նկ. 1. Իմունազոդուկների ցուցանիշը՝ վակցինացված, ՊՅՊ+վակցինացված և ինտակտ խմբի կենդանիների մոտ



Աղյուսակ.3. Ճագարների ինֆեկցիոն անաերոբային էստերոտոցենմիայի նկատմամբ իմունացված ճագարների արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկությունը ճագարների, ծովախոզուկների և մկների վրա, n=12

| Խումբ      |           | Զափաբաժին                             |     |                 |        | Անկում |        |   |        | Ընդամենը |    | Մնացել են կենդանի, % |
|------------|-----------|---------------------------------------|-----|-----------------|--------|--------|--------|---|--------|----------|----|----------------------|
|            |           | Արյան շիճուկ, մլ<br>5.0<br>1.0<br>0.5 |     | Cl.perfringens. | 24-48ժ |        | 72-96ժ |   | 5-10օր |          |    |                      |
|            |           |                                       |     |                 |        |        |        |   |        |          | մլ |                      |
| Ծագար      | փորձնական | Պատվաստված                            | 0,5 | 0               | 12     | 2      | 10     | 0 | 10     | 2        | 10 | 83,3                 |
|            |           | Գալարմին + պատվաստված                 | 0,5 | 0               | 12     | 0      | 12     | 0 | 12     | 0        | 12 | 100                  |
|            | ստուգիչ   | Նորմալ կենդ. արյան շիճուկ             | 0,5 | 3               | 9      | 6      | 3      | 1 | 2      | 10       | 2  | 16,6                 |
|            |           | Մանրեական աճեցվածք                    | 0,5 | 6               | 6      | 4      | 2      | 1 | 1      | 11       | 1  | 8,3                  |
|            |           | Ֆիզիոլոգ.լուծույթ                     | 0,5 | 0               | 12     | 0      | 12     | 0 | 12     | 0        | 12 | 100                  |
| Ծովախոզուկ | փորձնական | Պատվաստված                            | 0,2 | 2               | 10     | 4      | 6      | 2 | 4      | 8        | 4  | 33,3                 |
|            |           | Գալարմին + պատվաստված                 | 0,2 | 1               | 11     | 3      | 8      | 2 | 6      | 6        | 6  | 50                   |
|            | ստուգիչ   | Նորմալ կենդ. արյան շիճուկ             | 0,2 | 6               | 5      | 4      | 1      | 0 | 1      | 11       | 1  | 8,3                  |
|            |           | Մանրեական աճեցվածք                    | 0,2 | 8               | 4      | 3      | 1      | 1 | 0      | 12       | 0  | -                    |
|            |           | Ֆիզիոլոգ.լուծույթ                     | 0,2 | 0               | 12     | 0      | 12     | 0 | 12     | 0        | 12 | 100                  |
| Մուկ       | փորձնական | Պատվաստված                            | 0,2 | 1               | 11     | 0      | 11     | 0 | 11     | 1        | 11 | 83,3                 |
|            |           | Գալարմին + պատվաստված                 | 0,2 | 0               | 12     | 0      | 12     | 0 | 12     | 0        | 12 | 100                  |
|            | ստուգիչ   | Նորմալ կենդ. արյան շիճուկ             | 0,2 | 4               | 8      | 6      | 2      | 0 | 2      | 10       | 2  | 16,7                 |
|            |           | Մանրեական աճեցվածք                    | 0,2 | 5               | 7      | 5      | 2      | 2 | 0      | 12       | 0  | -                    |
|            |           | Ֆիզիոլոգ.լուծույթ                     | 0,2 | 0               | 12     | 0      | 12     | 0 | 12     | 0        | 12 | 100                  |

Աղ. 3 տվյալները ցույց են տալիս, որ *Cl. perfringens*-ի **Ab** շիճուկաբաժնական տիպի հակածինը օժտված է լիարժեք իմունածին հատկությամբ, որի վկայությունը այդ հիվանդության վարակունակ հարուցիչի թույնների նկատմամբ պաշտպանիչ հակամարմինների սինթեզումն է: Ակնհայտ է, որ նշված պատվաստանյութի հետ օգտագործման իմունախթանիչ գալարմինը զգալիորեն ակտիվացնում է իմունածնությունը շուրջ 17%-ով ճագարների համակցված պատվաստման



դեպքում: Միայն պատվաստանյութով ճագարների իմունացման դեպքում վերջիններին արյան շիճուկը *Cl. perfringens*-ից պաշտպանում է 83,3%-ով, այն դեպքում, երբ գալարմիսով համակցված պատվաստման դեպքում իմուն շիճուկի պաշտպանիչ հատկությունը հասնում է 100%-ի: Հատուկ կարևորություն ենք տալիս մանրեական հակածնի վարակունակության ստուգիչ արդյունքներին: Այս դեպքում ճագարների անկումը կազմում է 91,7 %, այսինքն օրգանիզմի բնական պաշտպանիչ հարմարանքները հզորագրու վիրուլենտ թույնին դիմակայում են 8,3 %-ով: Օրգանիզմի պաշտպանիչ մեխանիզմին ենք վերագրում նաև նորմալ արյան շիճուկի հակակոստորիդիոզային դիմակայումը, որը կազմում է 16,7 %: Այսպիսով, առաջին խմբի արյան շիճուկի հակակոստորիդիոզային պաշտպանությունը ցույց է տալիս, որ պատվաստման արդյունքում իմուն շիճուկի ակտիվությունը կազմում է 83,3%, քանի որ նրանից 16,75%-ը բաժին է ընկնում օրգանիզմի բնական դիմադրողականությանը և նորմալ արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկությանը: Եթե հաշվի առնենք նաև իմունախթանիչին վերագրվող պաշտպանիչ ակտիվությունը, ապա հետվակցիկացման (հետպատվաստման) արյան շիճուկի հակամանրեական պաշտպանիչ հատկությունը կկազմի 66,7%, իսկ գալարմիսով համակցված պատվաստումի դեպքում կկազմի 83,3%: Նույն հետազոտություններում, որոնք անցկացվել են ծովախոզուկների և մկների վրա, արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկությունը զգալիորեն գիջում է ճագարների, մկների նկատմամբ կատարված համաձայն հետազոտություններից ստացված ցուցանիշներին: Այսպես, վակցինացված ծովախոզուկների արյան շիճուկներից պաշտպանվում է ընդամենը 33,3%, այսինքն 12 ծովախոզուկներից հիվանդության հարուցիչի (թույներին) դիմակայել են 4-ը, մինչդեռ գալարմիսով մշակման դեպքում արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկությունը բարձրանում է շուրջ 16,7%-ով և կազմում 50 %, այսինքն 12 մկներից արյան շիճուկը թունային վարակին դիմակայել է կիսով չափ:

3-րդ խմբում ևս ստացվել է գրեթե նույն պատկերը, ինչպես առաջինում: Վակցինացված (պատվաստված) սպիտակ մկների արյան շիճուկը մկներին պաշտպանել է 91,73%, իսկ գալարմիսով մշակված և պատվաստված կենդանիներից ստացված արյան շիճուկը ցուցաբերել է առավելագույն ակտիվություն և *Cl. perfringens* թույնից պաշտպանել է 100%: Ստացված ցուցանիշները համարում ենք իմունազոյացման բարձր դրսևորում:

## ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Բաղայան Ա.Ս.* Միբիրախտի թիվ 55 շտամով վարակված սպիտակ մկների արյան շիճուկի սպիտակուցների քանակական փոփոխությունները գալարմիսի ազդեցությամբ . ՀՀ ԳԱՄ Զեկուցներ, էջ 102-109, 2012.
2. *Գարրիբյան Տ.Զ., Գրիգորյան Ա.Լ.* ճագարների վիրուսային արյունահոսային հիվանդության և պատերեցողի դեմ իմունացված կենդանիների արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկության որոշումը, Ազրոգիտություն, էջ 30-33, Երևան, 2003.
3. *Գալոյան Ա.Ա., Գրիգորյան Ա.Լ., Սարգսյան Մ.Ա.* Գալարմիսի կիրառումը ինֆեկցիոն էստերոտոքսեմիայի հարուցիչ՝ *Clostridium perfringens*-ով պայմանավորված գազային գանգրենայի բուժման և կանխարգելման միջոց. Արտոնագիր 2637A , 2012 .
4. *Գրիգորյան Ա.Լ., Սոսքեյան Դ.Թ.* Իմունացված ճագարների արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկության որոշումը սպիտակ մկների վրա. Ազրոգիտություն, էջ 171-173, Երևան, 2011.
5. *Շատուրյան Լ. Դ.* Միբիրախտի նկատմամբ վակցինացված կենդանիների արյան շիճուկի պաշտպանիչ հատկության որոշումը. Գյուղատնտեսության և բնապահպանության հիմնախնդիրները Անդրկովկասի տարածաշրջաններում, էջ 46-49, Երևան, 2002.
6. *Петросян С.П.* Превентивное свойство сыворотки крови животных, иммунизированных против колибактериоза. Известия ГАУА, Ереван, С. 60-64, 2007.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, հավելված 1 (66), 2014

## ***Heracleum sosnovskyi* Manden ԲՈՒՅՍԻ ՖՈՏՈՍԵՆՍԻԲԻԼԻԻԶԱՑՈՂ ԱՂԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ**

**Թ. Ե. ՍԵՖԵՐՅԱՆ**

Ա. Ի. Ալիխանյանի անվ. ազգային գիտական լաբորատորիա (Երևանի ֆիզիկայի ինստիտուտ)  
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ  
seferyant@yahoo.com

Ուսումնասիրվել է Սոսնովսկու բալդղան (*Heracleum sosnovskyi* Manden) բույսի հյութի ֆոտոինդուցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպիդային երկշերտ կառույցներ հանդիսացող լիպոսոմների, ինչպես նաև *Escherichia coli* բակտերիաների K12 (վայրի տիպ) շտամի վրա: Բացահայտվել է, որ *H. sosnovskyi* բույսի հյութի առկաությունը միջավայրում անդրմանուշակագույն ճառագայթներով ֆոտոինդուցման արդյունքում առաջ է բերում ինտենսիվ ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող թաղանթային կառույցների լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում, որը արտահայտվում է քիմիլումինեսցենսման ինտենսիվության մակարդակի և լիպիդների օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի կոնցենտրացիայի ավելացմամբ:

*Լիպոսոմ - ազատ ռադիկալներ - ֆոտոսենսիբիլիզացում -  
քիմիլումինեսցենսում - Սոսնովսկու բալդղան*

Исследовано влияние фотоиндуцированных свободных радикалов сока борщевика Сосновского (*Heracleum sosnovskyi* Manden) на липидные бислойные мембраны — липосомы, а также на бактерии *Escherichia coli* K12. Выявлено, что присутствие в среде сока борщевика Сосновского при фотоиндуцировании ультрафиолетовыми лучами приводит к интенсивному цепному свободно-радикальному перекисному окислению липидов мембранных структур, которое проявляется повышением интенсивности хемилюминесценции и концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида.

*Липосома - свободные радикалы - фотосенсибилизация -  
хемилюминесценция - Борщевик Сосновского*

The influence of photoinduced free radicals of Sosnowsky's Hogweed (*Heracleum sosnovskyi* Manden) sap on lipid bilayer membranes — liposomes, as well as on the bacterium *Escherichia coli* K12 is investigated. It has been discovered that the presence of sap of *H. sosnovskyi* in medium at the ultraviolet irradiation leads to the intensive free radical chain peroxidation of the lipids of bilayer structures, which is evidenced by an increase in the intensity of chemiluminescence and the concentration of the end-product of lipid peroxidation-malonic dialdehyde.

*Liposome - free radicals - chemiluminescence - fotosensitizing - Sosnowsky's Hogweed*

Ներկայումս բժշկության մեջ լայն տարածում են գտել ֆոտոդինամիկ թերապիայի մեթոդները, որոնք հիմնված են ֆոտոսենսիբիլիզացնող նյութեր պարունակող տարբեր դեղամիջոցների վրա [7]: Ֆոտոդինամիկ թերապիայում կիրառվող ֆոտոսենսիբիլիզացնող նյութերի մեծ մասը հիմնականում էլեկտրամագնիսական սպեկտրի տեսանելի տիրույթում արտահայտված ֆոտոսենսիբիլիզացնող հատկությամբ միացություններ են: Առկա են նաև ֆոտոսենսիբիլիզացնող հատկությամբ միացություններ, որոնք գործում են անդրմանուշակագույն տիրույթի ալիքների ազդեցության դեպքում: Այս նյութերի մի զգալի մասը բավական մեծ քանակներով առկա է տարբեր բուսատեսակներում: Այդ շարքին է պատկանում Սասնովսկու բալդոդանը (*Heracleum sosnovskyi* Manden), որը պարունակում է մեծ քանակությամբ ֆուրանոկումարիններ, մասնավորապես կսանտոնոքսին, բեռզապտեն, ամբելիֆերոն, անգելիցին և սֆոնդին [3, 6]: *H. sosnovskyi* բույսը, ունենալով բավական մեծ հարմարվողականություն, շրջակա միջավայրում ներկայումս ունի լայն տարածվածություն [8]: Պարունակելով մեծ քանակով ֆուրանոկումարիններ *H. sosnovskyi* բույսը ունի ֆոտոտոքսիկ հատկություն: Այս բույսի հյուսքը ընկնելով կաթնասունների մաշկի վրա արևի լույսի ազդեցությամբ առաջ է բերում 1-3րդ աստիճանի այրվածքներ [2]: Տոքսիկ էֆեկտներ առաջանում են նաև սննդում այս բույսից մեծ քանակությամբ թարմ վիճակում օգտագործելիս: Այրվածքների առաջացման մեխանիզմի հիմքում ընկած է այն հանգամանքը, որ ֆուրանոկումարինները անդրմանուշակագույն ճառագայթման դեպքում առաջացնում են սինգլետ թթվածին [12], որն իր հերթին առաջ է բերում ազատ ռադիկալային բնույթի բազմաթիվ պրոցեսներ: Ելնելով վերը բերվածից, աշխատանքում ուսումնասիրվել է բջջի կենսագործունեության համար առանձնակի կարևոր նշանակություն ունեցող թաղանթային կառույցներում ընթացող ազատ ռադիկալային գերօքսիդային օքսիդացման պրոցեսների վրա *H. sosnovskyi* բույսի ֆոտոսենսիբիլիզացնող ազդեցությունը:

#### **Նյութ և մեթոդ:**

Գիտավործերում օգտագործվել են ՀՀ Արարատի մարզի "Խոսրովի անտառ" արգելոցի տարածքում ազատ աճող *H. sosnovskyi* բույսի ցողունային հատվածները: Բույսի հյուսքը՝ բուսամզվածքը ստացվել է թարմ բույսի ցողունի 1 սմ երկարությամբ կտրատված հատվածներից, սառը (~4 °C) պայմաններում, մամլման միջոցով: Լիպոսոմների ստացման համար օգտագործվել է նախատեսված լիպիդային խառնուրդ Sigma-Aldrich L 4395: Լիպոսոմները ստացվել են 0,1Մ NaCl լուծույթում 0,01 մգ/մլ կոնցենտրացիայով ֆոսֆոլիպիդների կախույթի գերծայնային մշակման եղանակով [9, 10]:

Դիտարկվող ազատ ռադիկալային մեխանիզմով ընթացող գործընթացների ուսումնասիրման համար ընտրվել է քիմյումիլեսցենսային (ՋԼ) անալիզի և մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵԱ) սպեկտրաֆոտոմետրիկ որոշման մեթոդները:

ՋԼ անալիզը կատարվել է H9319-02 (Hamamatsu-Japan) քվանտոմետրիկ սարքի միջոցով, իմպուլսային ռեժիմում [11]: ՋԼ գրանցումների ժամանակ ֆոտոբազմապատկիչին ներդրված լարումը կազմել է 900 Վ, իսկ ինտեգրացման ժամանակը՝ 1 վ: Նմուշների ճառագայթահարման համար որպես անդրմանուշակագույն ճառագայթման աղբյուր օգտագործվել է DPT-125 տիպի լամպ, որի առաքման տիրույթը կազմում է 230-400 նմ: Նմուշների ճառագայթահարումը կատարվել է կյուվետում, որտեղ ճառագայթահարվող նյութի շերտն ունեցել է 5 մմ հաստություն, իսկ մակերեսը գտնվել է լույսի աղբյուրից 100 մմ հեռավորության վրա: ՋԼ ինտենսիվության գրանցումն իրականացվել է օպտիկական բաժակում, որում փորձարկվող հեղուկի ծավալը կազմել է 3 մլ, իսկ ավելացվող նմուշների ծավալը եղել է 0,25 մլ: ՋԼ ինտենսիվության գրանցումները կատարվել են ճառագայթահարման ավարտից 5 վ անց: Զլ ինտենսիվությունների գնահատման համար վերցվել են ՋԼ լուսագումարի միջին արժեքները 60 վ գրանցման համար:

Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ ՄԵԱ քանակական որոշումը կատարվել է սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 2-թիոբարբիտոլաթթվի թեստի միջոցով, Specord M-40 սպեկտրաֆոտոմետրի օգնությամբ, 532 նմ ալիքի երկարության տակ [5]:

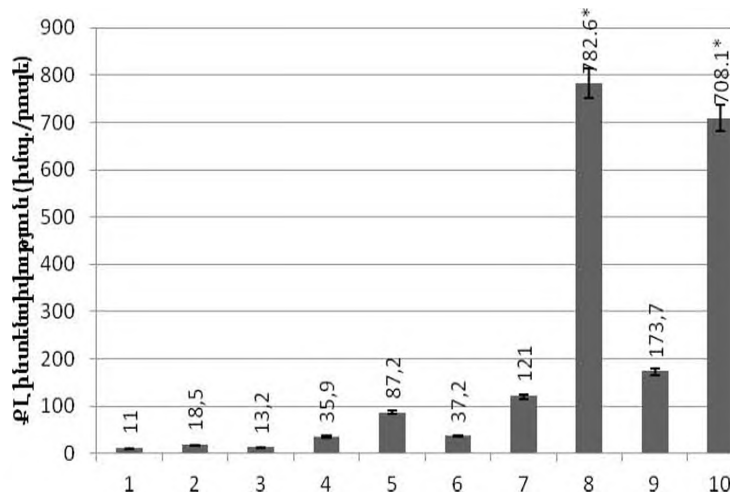
*E. coli* K12 (վայրի տիպ) շտամը աճեցվել է անաերոբ պեպտոնային միջավայրում (pH 7,2-7,4), 0,2 %-անոց գլյուկոզի ավելացմամբ: Բակտերիաները աճեցվել են 18 ժ, 370 °C ջերմաստիճանում: Բակտերիաների զանգվածը ստացվել է աճման միջավայրը 20 րոպե 5000 պտ./րոպե արագությամբ կրկնակի ցնտրիֆուգմամբ, որտեղ միջանկյալ լուծիչ է հանդիսացել թորած ջուրը [1, 4]: Բակտերիաների փորձարարական կախույթը ստացվել է անջատված բակտերիալ պրեցիպիտատի 100 անգամ Նոսրացմամբ (0,1Մ NaCl): Չափումներն

իրականացվել են 20 °C ջերմաստիճանում: Գրանցված ԶԼ արժեքների միջին թվաքանակային շեղումները չեն գերազանցում 5%-ը: Ստացված արդյունքները ենթարկվել են ստատիստիկ վերլուծության և գնահատվել ըստ Ստյուդենտի t-թեստի: Արդյունքները համարվել են հավաստի \* = p<0.05 արժեքի դեպքում:

#### Արդյունքներ և քննարկում:

*H. sosnovskyi* բույսի ֆոտոսինթիզի լիզացնող հատկության ուսումնասիրման համար որպես թաղանթային մոդելային համակարգ մեր կողմից ընտրվել են լիպոսոմները, որոնց հաճախ դիտարկում են որպես բջջի լիպիդային երկշերտ թաղանթների պարզեցված տարբերակ: Իսկ բնական թաղանթային համակարգերի վրա *H. sosnovskyi* բույսի ֆոտոսինթիզի լիզացնող հատկության ուսումնասիրման համար օգտագործվել են *E. coli* K12 բակտերիաները:

Պարզելու համար ԶԼ ինտենսիվության մեջ փորձարկվող նյութերի սպոնտան ԶԼ մասնաբաժինը, սկզբում չափվել են վերջիններիս սպոնտան ԶԼ արժեքները: Բուսամզվածքի, լիպոսոմների կախույթի և բակտերիալ կախույթի սպոնտան ԶԼ արժեքները բերված են Նկ.1-ում: Չափվել են նաև փորձարկվող նյութերի միմյանց հետ հավանական փոխազդման սպոնտան ԶԼ արժեքները ֆոտոինդուկցված ԶԼ (ՖԶԼ) ինտենսիվության մեջ դրանց մասնաբաժինը գնահատելու համար: 3 մլ/0,25 մլ համապատասխան ծավալների դեպքում լիպոսոմային կախույթի և բակտերիալ կախույթի հավանական սպոնտան ԶԼ արժեքները բուսամզվածքի ավելացմամբ բերված են Նկ. 1-ում: Գնահատվել է նաև ՖԶԼ ինտենսիվության մեջ փորձարկվող նյութերի սեփական ՖԶԼ մասնաբաժինը:



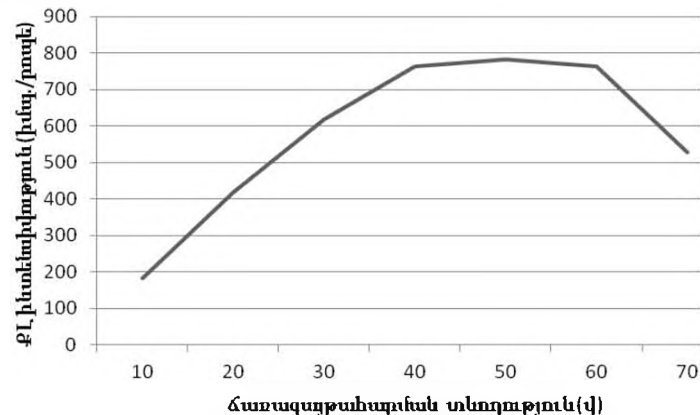
Նկ.1. *H. sosnovskyi* բույսի հյուսվածքի ազդեցությունը լիպոսոմների և բակտերիաների ՖԶԼ-ն վրա:

1. Բուսամզվածքի ԶԼ (3 մլ 0,1M NaCl + 0,25 մլ հյուսվածք), 2. Լիպոսոմային կախույթի ԶԼ, 3. Բակտերիաների կախույթի ԶԼ, 4. Բուսամզվածքի ՖԶԼ (3 մլ 0,1M NaCl + 0,25 մլ հյուսվածք), 5. Լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ, 6. Բակտերիաների կախույթի ՖԶԼ, 7. Լիպոսոմային կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ԶԼ, 8. Լիպոսոմային կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ՖԶԼ, 9. Բակտերիաների կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ԶԼ, 10. Բակտերիաների կախույթի և նրան ավելացված բուսամզվածքի ՖԶԼ:

Ֆոտոինդուկցման ժամանակը բոլոր տարբերակներում եղել է հաստատուն և կազմել է մոտ 50 վ: Վերջինս որոշվել է ուղղորդող փորձերի միջոցով որպես բուսամզվածքի ավելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ մաքսիմալ ինտենսիվություն ապահովող մինիմալ ժամանակային արժեք (Նկ. 2):

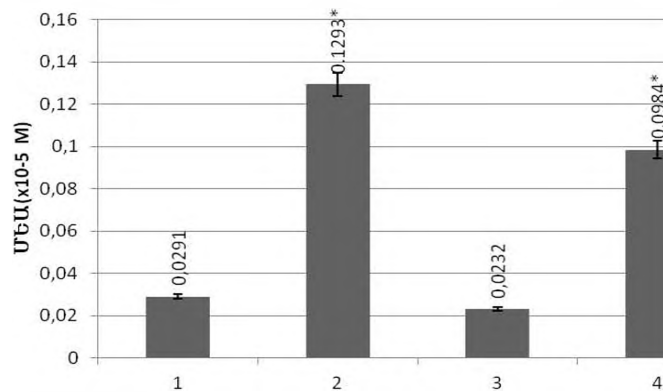
Գրանցված ԶԼ ինտենսիվության արժեքները համեմատելով միմյանց հետ կարելի է արձանագրել, որ բուսամզվածքի ավելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվությունը ստուգիչ տարբերակների համեմատ ունի ակնհայտ բարձր ցուցանիշ մոտ 546 % (Նկ.2): Նմանատիպ բարձր արժեք է գրանցվում նաև բուսամզվածքի ավելացմամբ բակտերիաների կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվության համար մոտ 307 % (Նկ.2):

Ինչպես հայտնի է, լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման գնահատման ուղղակի եղանակներից է ՄԵԱ-ի որոշումը 2-թիոբարբիտուրաթթվի միջոցով [1, 4]: Ի լրացում ԶԼ անալիզի մեթոդին կատարվել է բուսամզվածքի առկայությամբ ֆոտոինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությամբ պայմանավորված ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխության գնահատում լիպոսոմային և բակտերիալ կախույթներում:



Նկ. 2. *H. sosnovskyi* բույսի հյուսիսի ավելացմամբ լիպոսոմային կախույթի ՖԶԼ ինտենսիվության կախվածությունը ֆոտոինդուկցման տևողությունից:

Չափումները ցույց տվեցին, որ բուսամզվածքի առկայության դեպքում ճառագայթահարումից հետո լիպոսոմային և բակտերիալ կախույթներում ՄԵԱ-ի քանակը ավելանում է համապատասխանաբար 344 % և 324 %-ով, ի համեմատ առանց բուսամզվածքի ավելացմամբ ստուգիչ տարբերակների (նկ. 3):



Նկ. 3. ՄԵԱ-ի քանակական ցուցանիշները լիպոսոմների և բակտերիաների կախույթներում նորմայում, ճառագայթահարումից հետո և *H. sosnovskyi* բույսի հյուսիսի առկայությամբ ճառագայթահարումից հետո: 1. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախույթում: 2. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախույթում բուսամզվածքի ավելացումից և ճառագայթահարումից հետո: 3. ՄԵԱ-ի քանակը բակտերիաների կախույթում: 4. ՄԵԱ-ի քանակը բակտերիաների կախույթում բուսամզվածքի ավելացումից և ճառագայթահարումից հետո:

Գրանցված ԶԼ ինտենսիվության և ՄԵԱ-ի քանակական աճը վկայում է այն մասին, որ բուսամզվածքի ֆուրանոկումարինների ֆոտոինդուկցման արդյունքում առաջացած ազատ ռադիկալները փոխազդում են լիպոսոմներում լիպիդային երկշերտի հետ, առաջ բերելով ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:

Ընդհանրացնելով ստացված արդյունքները, կարելի է եզրակացնել, որ բուսամզվածքից առաջացող ֆոտոդինամիկ այրվածքների հիմքում ընկած է հյուսիս բաղադրության մեջ առկա ֆուրանոկումարիների ֆոտոդինամիկացման արդյունքում առաջացող ազատ ռադիկալների կողմից բջջի թաղանթային կառույցների լիպիդների շղթայական մեխանիզմով ընթացող գերօքսիդային օքսիդացումը, որը շարունակվում է նաև անդրմանուշակագույն ճառագայթների ներգործությունից հետո: Վերը բերված տվյալները կարող են օգտակար լինել *H. sosnovskyi* բույսի հիմքի վրա պատրաստվող դեղամիջոցների մշակման, ինչպես նաև բույսի հետ շփումից առաջացած այրվածքների բուժման պրոցեսում:

#### ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Թոյունյան Ա., Բաղրամյան Կ., Փղարյան Ա. Կենսաբանական թաղանթների կենսաֆիզիկա և կենսաէներգետիկա: Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ: Երևան, Կրթական քարտիչությունների կենտրոն, 2003.
2. Дальке И.В., Чадин И.Ф. Методические рекомендации по борьбе с неконтролируемым распространением растений борщевика Сосновского. Республика Коми, Сыктывкар, 2008.
3. Мурадян А.А., Априкян С.В. Кумариновые производные видов *Heracleum L.* из флоры Армении - *H. sosnovskyi* Mand. *H. Trachyloma* Fish. Et Mey., // Биолог. ж. Ар., 29 (9), 1976.
4. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г., Семенова Е.В., Мильникова С.И. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под. ред. Н. С. Егорова), М., Издательство Московского университета, 1983.
5. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии (под. Ред. Ореховича В. Н.), М., Медицина, 1977.
6. Юрлова Л.Ю., Черняк Д.М., Кутюкова О.П. Фурукумарины *Heracleum sosnovskyi* и *Heracleum moellendorffii*, // Тихоокеанский медицинский журнал, 2, с. 91-93, 2013.
7. Alison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X., Childs C.Jh., Sibeta C.H. Photosensitizers in clinical PTD, // J. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Elsevier, 1, p 27-42, 2014.
8. Jakubowicz O., Żaba C., Nowak G., Jarmuda S., Żaba R., Marcinkowski J.T. *Heracleum sosnovskyi* Manden. // J. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 19, 2, p. 327-328, 2012.
9. Medda S., Das N., Mahato S.B., Mahadevan P.R., Basu M.K. Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*.// Indian J. Biochemist and Biophysics, 32, 3, p. 147-151, 1995.
10. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membrane in Aqueous Solution. // J. Phys. Chem, 67, p.534-535, 1963.
11. Seferyan T.Ye., Mamikonyan V.Kh., Hovhannisyan A.H., Elbakyan V.L. "Automatised chemiluminometric equipment for biomedical and chemical analyses" The collection of articles of IV International Scientific and Practical Conference "High-tech, basic and applied research in physiology and medicine", V 2, -138p., November 15-16, 2012, St. Petersburg, Russia.
12. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). // J. JAC, 42, p. 13-28, 1998.



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-фосфогидролазы И ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА SkQ1 В МИТОХОНДРИЯХ ТКАНЕЙ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ СУДОРОГАХ

А.А. СИМОНЯН<sup>1</sup>, Р.А. СИМОНЯН<sup>2</sup>, А.С. МАРГАРЯН<sup>1</sup>,  
Л.А. СИМОНЯН<sup>3</sup>, Р.Б. БАДАЛЯН<sup>1</sup>, М.М. ГУРОГЛЯН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. Г.Бунятяна НАН РА

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, РФ

<sup>3</sup>Кафедра медико-биологических дисциплин Московского областного государственного  
социально-гуманитарного университета РФ  
anahit78.78@mail.ru

При экспериментальных эпилептиформных судорогах у белых крыс, в отличие от  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы, экзогенная инъекция антиоксидантной SkQ1 не нивелирует изменения в активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы.

*Митохондрии -  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФаза - SkQ1 - эпилептиформные судороги*

Սպիտակ առնետների փորձարարական էպիլեպսիաների ընթացքում, ի տարբերություն  $\text{Mg}^{2+}$ -կախյալ ԱՄՖձ, SkQ1 հակաօքսիդանտի էկզոգեն ներարկման դեպքում տարբեր հյուսվածքներից անջատված միտոքոնդրիումներում  $\text{Ca}^{2+}$ -կախյալ ԱՄՖձի ակտիվության շեղումների նկատելի համահարթեցում չի դրսևորվում:

*Միտոքոնդրիումներ -  $\text{Ca}^{2+}$ -կախյալ ԱՄՖձ - SkQ1 - էպիլեպսիաներ*

At experimental epileptiform convulsions on white rats as opposed to  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase, SkQ1 antioxidant exogenous injection not displayed correlation effects on changes of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase activity.

*Mitochondria -  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase - SkQ1 - epileptiform convulsions*

В Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова осуществлен синтез катионных производных пластохинона (SkQ), содержащих положительно заряженные остатки ацилтрифенилфосфония или родамина, соединенные с пластохиноном посредством деканового или пентанового линкера. Показано, что различные формы SkQ легко проникают через

плоскую бислойную фосфолипидную мембрану через мембраны митохондрий и внешнюю клеточную мембрану, электрофоретически накапливаются в изолированных митохондриях и в митохондриях живых клеток [8, 10, 15]. В низких (наномолярных) концентрациях проявляют высокую антиоксидантную активность в водных растворах, липидных мицеллах, изолированных митохондриях, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала  $\text{OH}^\bullet$ , увеличивают выживаемость клеток гиперчувствительных к активным формам кислорода (АФК) [9, 13]. АФК представляют серьезную опасность для клеток и всего организма. Авторами было показано, что они образуются в гидрофобной области внутренней мембраны этих органелл и инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов и являются серьезной угрозой для живых систем. Более того, митохондриальные АФК способны также вызывать окислительные повреждения митохондриальной ДНК, локализованной вблизи внутренней мембраны [1]. Было показано также, что при увеличении концентрации SkQ проявляются его прооксидантные свойства [9].

В представленной работе мы поставили цель исследовать возможное участие SkQ1 в коррекции отклонения в каталитической активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях различных органов белых крыс при пентилентетразол-индуцированной эпилепсии.

Биохимические механизмы патогенеза эпилепсии связаны с расстройством ионных, медиаторных и энергетических процессов. Ионные сдвиги ведут к повышению мембранной проницаемости и усилению в результате этого деполяризации нейронов, их сверхвозбудимости. Снижение запасов глюкозы и накопление молочной кислоты в тканях головного мозга во время приступа эпилепсии являются причиной ацидотических сдвигов, усугубляющих гипоксию и снижающих уровень фосфатных соединений. В наших предыдущих работах [3, 4, 5] было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом (ПТЗ), статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в различных органах у белых крыс, а эндогенно введенный  $\alpha$ -токоферол и его синергист – тиосульфат натрия выступают в роли антиоксидантного стимулятора эндогенной системы антирадикальной защиты клетки.

На основании приведенного мы в опытах *in vivo* исследовали влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на сдвиги активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях, выделенных из различных органов белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных припадках.

Известно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза осуществляет активный перенос ионов кальция через мембраны клеток, поддерживая низкую концентрацию этих ионов в клетке ( $10^{-7}\text{M}$ ) по сравнению с окружающей средой и внутриклеточными депо ( $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ). Поддерживает эту разницу система активного транспорта ионов кальция, главную роль в котором играет кальциевый насос -  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза. Здесь мы имеем дело не с одним ферментом, а группой кальциевых АТФаз, различающихся по локализации в клетке, строению и способу регуляции. Но все эти ферменты переносят ионы кальция из цитоплазмы во внеклеточную жидкость или внутриклеточные депо кальция-пузырьки эндоплазматического ретикулума за счет энергии гидролиза АТФ, поддерживая тем самым низкую концентрацию ионов кальция в цитоплазме. Входя в клетку, эти ионы активируют множество внутриклеточных процессов, как, например, сокращение мышцы, которое начинается с выхода ионов Ca из саркоплазматического ретикулума и его взаимодействия с сократительными белками.



### Материал и методика.

Опыты проводили на 20-ти беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали однократным введением ПТЗ внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г массы животного. Подопытные животные были разделены по следующим группам (в каждой по 5 животных):

- I. животным (контрольная группа) вводили 1мл физраствора
- II. животным один раз в день 2 дня подряд вводили SkQ1 (в расчете 37 нм SkQ1 в 1мл воды)
- III. животным вводили ПТЗ 8 мг на 100 г массы животного в 1мл воды.
- IV. животным вводили SkQ1 + ПТЗ.

Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции ПТЗ. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine [14].

Животных декапитировали после полного проявления генерализованных тонико-клонических судорог. После декапитации соответствующие ткани быстро извлекали, промывали в охлажденном растворе 0.25 М сахарозы- 0.02 М трис-НСl буфера (pH 7.4).

Измельченные ткани гомогенизировали в том же буфере гомогенизатором с тефлоновым пестиком. Ядерную фракцию из гомогената различных тканей выделяли центрифугированием при 600-800 g, а митохондрии мозга – при 18000 g, сердца и селезенки – 12000 g, печени - 9000 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий суспендировали в 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис НСl буфере и центрифугировали повторно.

Инкубационная смесь (1мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис-НСl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствующих 2-3 мг белка), 0.1 мл (2 mM) АТФ (производства Sigma chem. corp., США), растворенного в сахарозе-трис-НСl буфере и 0.1 мл 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) в конечной концентрации [3, 6, 7]. Время инкубации смеси 30 мин при температуре 37°C. Об активности АТФазы судили по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата, который определяли по Лоури и соавт. [11], в модификации Скулачева [7] и пересчитывали на мг белка [12]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [2].

### Результаты и обсуждение.

В табл. 1 приведены данные экспериментов по изучению сдвигов активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы в интактных митохондриях мозга крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах под воздействием SkQ1.

Таблица 1. Влияние SkQ1 на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях мозга белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.  
( $\Delta P$  в мкатамах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ; n=9

| Митохондрии | Контроль        | SkQ1                          | ПТЗ                          | ПТЗ + SkQ1                   |
|-------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Мозг        | 2.24 $\pm$ 0.12 | 2.67 $\pm$ 0.09<br>p < 0.025* | 1.25 $\pm$ 0.10<br>p < 0.001 | 1.24 $\pm$ 0.05<br>p < 0.001 |

\*Здесь и в следующих таблицах p - по сравнению с контролем.

Приведенные результаты показывают, что при внутримышечном введении крысам SkQ1 АТФазная активность в митохондриях мозга повышается. При инъекции же ПТЗ каталитическая активность фермента, наоборот, угнетается по сравнению с SkQ1. Такая же картина наблюдается при совместном введении ПТЗ и SkQ1.

В тех же условиях опыта наблюдается иная картина активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы в печеночных митохондриях. При внутримышечном введении SkQ1 в активности фермента, по сравнению с контролем, заметных изменений не наблюдается (табл. 2). Однако стимулируется активность фермента при совместном введении ПТЗ и SkQ1.

А.А. СИМОНЯН, Р.А. СИМОНЯН, А.С. МАРГАРЯН, Л.А. СИМОНЯН, Р.Б. БАДАЛЯН, М.М. ГУРОГЛЯН

Под влиянием ПТЗ активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы так же достоверно повышается по сравнению с контролем. Полученные данные об активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях селезенки приведены в табл. 3. SkQ1 приводит к достоверному (165.4 %) повышению активности АТФазы по сравнению с митохондриями той же ткани intactных животных. Введение животным только ПТЗ, как и при совместном введении ПТЗ и SkQ1, стимулирует активность фермента более чем в два раза, по сравнению с контролем.

**Таблица 2. Влияние SkQ1 на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях печени белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.**  
( $\Delta P$  в мкатомах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ;  $n=9$

| Митохондрии | Контроль        | SkQ1                           | ПТЗ                            | ПТЗ + SkQ1                     |
|-------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Печень      | $1.90 \pm 0.01$ | $1.82 \pm 0.02$<br>$p < 0.010$ | $2.71 \pm 0.04$<br>$p < 0.001$ | $3.15 \pm 0.08$<br>$p < 0.001$ |

**Таблица 3. Влияние SkQ1 на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях селезенки белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.**  
( $\Delta P$  в мкатомах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ;  $n=9$

| Митохондрии | Контроль        | SkQ1                           | ПТЗ                            | ПТЗ + SkQ1                     |
|-------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Селезенка   | $1.69 \pm 0.05$ | $4.49 \pm 0.13$<br>$p < 0.001$ | $3.41 \pm 0.12$<br>$p < 0.001$ | $3.71 \pm 0.07$<br>$p < 0.001$ |

Интересные результаты активности фермента получены в изолированных митохондриях сердца (табл. 4). Согласно таблице изолированные митохондрии миокарда наделены более высокой каталитической активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы по сравнению с аналогичными органеллами других органов. В митохондриях миокарда под влиянием введенного крысам SkQ1 активность фермента несколько подавляется. Однако при введении животным ПТЗ, наоборот, активность фермента заметно (58.0 %) стимулируется. Аналогичные результаты в активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы получены также при совместной инъекции ПТЗ и SkQ1.

**Таблица 4. Влияние SkQ1 на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в митохондриях сердечной ткани белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.**  
( $\Delta P$  в мкатомах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ;  $n=9$

| Митохондрии | Контроль         | SkQ1                           | ПТЗ                             | ПТЗ + SkQ1                      |
|-------------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Сердце      | $7.19 \pm 0.001$ | $6.29 \pm 0.37$<br>$p < 0.025$ | $11.36 \pm 0.33$<br>$p < 0.001$ | $10.34 \pm 0.22$<br>$p < 0.001$ |

Обобщая выше приведенные результаты экспериментов, можно заключить, что экзогенно введенный SkQ1, в отличие от  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, не нивелирует отклонения в активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в изолированных митохондриях различных тканей белых крыс с моделированным эпилептиформным припадком.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев В.П. и др. Производные пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. // Биохимия. 73(12). С. 1589-1606. 2008.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М. 1967.
3. Симонян Л.А., Симонян А.А., Карагезян К.Г. АТФ-фосфогидролазная активность в мозге крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом. // Биолог. ж. Армении. 56(3-4). С. 226-231. 2004.
4. Симонян Л.А., Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Маргарян А.С., Симонян Р.А., Карагезян К.Г. Корректирующий эффект  $\alpha$ -токоферола и тиосульфата натрия на активность АТФ-фосфогидролазы в митохондриях печени крыс с моделированным коразолом эпилептиформным припадком. // Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник. Санкт-Петербург. 10(5). С. 174-176. 2005.
5. Симонян Л.А., Симонян Г.М., Симонян А.А., Симонян М.А. Повреждающее воздействие эпилептогена коразола на металлопротеины крови *in vivo*. // Мед. наука Армении. 14(1). С. 30-33. 2005.
6. Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Симонян Л.А., Степанян Р.А., Галоян А.А. Регуляция энергетического метаболизма под действием обогащенного пролином полипептида гипоталамуса. // Нейрохимия. 1(2). С. 143-145. 2002.
7. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 564 стр. 1989.
8. Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kadzius kas Yu.L., Liberman E.A., Skulachev V.P., Topali V.P., Tsofina L.M., Vladimirova M.A. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. 1. Submitochondrial particles. // Biochem. Biophys. Acta. 216. P. 1-12. 1970.
9. James A.M., Cocheme H.M., Smith R.A. and Murphy M.P. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species, implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. // J. Biol. Chem. 28. P. 21295-21312. 2005.
10. Liberman E.A., Topali V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. // Nature. 222. P. 1076-1078. 1969.
11. Lowry O.H., Lopez J.A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. // J. Biol. Chem. 162. P. 421. 1946.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Parr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. // J. Biol. Chem. 193. P. 265-275. 1951.
13. Murphy M.P.S., Smith R.A. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47. P. 629-656. . 2007.
14. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. // Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 32. P. 281-294. 1972.
15. Severin S.E., Skulachev V.P., Yaguzinsky L.A. A possible role of carnitine in transport of fatty acids through the mitochondrial membrane. // Biokhimiya. 35. P. 1250-1257. 1970.



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## АКТИВНОСТЬ, СТЕПЕНЬ ОТИЦЕПЛЕНИЯ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ФЕРРИГЕМОГЛОБИНОМ ИЗОФОРМ NADPH ОКСИДАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН И ЭКЗОСОМ СЫВОРОТКИ ПАЦИЕНТОВ- НОСИТЕЛЕЙ РАКА ЖЕЛУДКА

Р.М. СИМОНЯН<sup>1</sup>, С.В. ПИРИНЯН<sup>2</sup>, М.А. БАБАЯН<sup>1</sup>, А.С. АЛЕКСАНИАН<sup>3</sup>,  
Г.М. СИМОНЯН<sup>1</sup>, А.Ф. ГРИГОРЯН<sup>3</sup>, С.С. АЛЕКСАНИАН<sup>3</sup>, М.А. СИМОНЯН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана

<sup>2</sup>Областной онкологический диспансер г. Гюмри

<sup>3</sup>Педагогический институт им. М. Налбандяна г. Гюмри

Maxim.simonyan@gmail.com

Впервые показано, что по сравнению с показателями донорской крови при раке желудка человека (срок давности 3-4 г) наблюдается уменьшение ( $14,3 \pm 2,2$  %,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) рилизинга NADPH оксидазы (Nox) из мембран эритроцитов (ЭМ), а также стимуляция ( $17,4 \pm 2,5$  %,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) рилизинга eNox из экзосом сыворотки крови. Одновременно в аналогичной динамике наблюдается изменение уровня комплексообразования Nox с ферригемоглобином. Притом на фоне повышения NADPH зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей активности наблюдается снижение ферриIb-восстанавливающей активности этих ферментов. Таким образом, нарушение окислительно-восстановительного статуса ЭМ и экзосом при раке желудка человека может быть обусловлено вышеуказанными изменениями.

*Рак желудка человека – эритроциты – сыворотка – NADPH оксидаза-рилизинг*

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ դոնորական արյան ցուցանիշների համեմատ ստամոքսի քաղցկեղով (3-4 տարի վաղեմությամբ) հիվանդ մարդկանց էրիթրոցիտների թաղանթների (ԷԹ) անկայունացումը առնչվում է այդ թաղանթներից NADPH օքսիդազի (Nox) արտազատման (ռիլիզինգ) ընկճման ( $14,3 \pm 2,2$  %,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) և արյան շիճուկի էկզոսոմներից eNox-ի ռիլիզինգի խթանման ( $17,4 \pm 2,5$  %,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) հետ: Դիտվում է նաև Nox-երի և ֆերրիհեմոգլոբինի միջև կոմպլեքսագոյացման մակարդակի նմանատիպ դիսամիկայով փոփոխում: Դրա հետ մեկտեղ, այդ Nox-երի NADPH կախյալ  $O_2^-$ -ի գոյացման ակտիվության աճին զուգընթաց տեղի ունի դրանց՝ ֆերրիհեմոգլոբինի վերականգնման ակտիվության ընկճում: Այսպիսով, այս փոփոխություններով կարող են պայմանավորված լինել ԷԹ-երի և էկզոսոմների օքսիդա-վերականգնման կարգավիճակի խախտումները մարդու ստամոքսի քաղցկեղի ժամանակ:

*Մարդու ստամոքսի քաղցկեղ – էրիթրոցիտներ – շիճուկ – NADPH օքսիդազ – ռիլիզինգ*

For the first time, in comparison with the indices of donor blood, in the blood of the patients of stomach malignant tumor (duration of disease 3-4 years) the

decrease ( $14,3 \pm 2,2\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) of the releasing of the NADPH oxidase (Nox) from membrane of erythrocyte (EM) and the increase ( $17,4 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) of the releasing of the Nox from serum exosomes was observed. Simultaneously, the identical change of the dynamics of the level of complex between the Nox and ferrihemoglobin take place. Moreover, on the background of the increase of the NADPH depended  $O_2^-$  produced activity and the decrease of the ferrihemoglobin-reduced activity of this enzyme was observed. Thus, these changes can be conditioned the breach of the oxidation-reduction status of EM and exosomes at the human stomach malignant tumor.

*Human stomach malignant tumor – erythrocytes – serum – NADPH oxidase - releasing*

Изоформы NADPH оксидазы (Nox) играют ключевую роль для пролиферации и развития нормальных и опухолевых клеток [8]. При злокачественных новообразованиях желудка человека наблюдается повышенная экспрессия Nox1 как фактора регуляции клеточной иммунной системы [10, 12]. Изоформы Nox локализованы не только в клеточных формированиях [1, 14], но и в экзосомах, локализованных в сыворотке крови и в биожидкостях различного характера, например, в сыворотке крови и жидкостях асцитных карцином [2, 3, 11]. За счет продуцируемых супероксидов экзосомы стимулируют внеклеточную иммунную систему и при канцерогенезе [6, 7, 15]. В свою очередь при канцерогенезе наблюдается существенное снижение стабильности эритроцитарных мембран (ЭМ), некоторый выброс гемоглобина в сыворотку крови и соответственное изменение уровня и активности изоформы Nox ЭМ [11].

Целью работы являлось определение характерных изменений оптических спектральных показателей, а также NADPH-зависимой супероксид( $O_2^-$ )-продуцирующей и ферригемоглобин(ферриHb)-восстанавливающей активности изоформ Nox из ЭМ и экзосом сыворотки крови пациентов с раком желудка по сравнению с показателями донорской крови.

**Материал и методика.**

С целью представления полученных нами данных для включения в историю болезни проанализирована венозная кровь (по 5 мл) 6-ти пациентов с раком желудка (РЖ) с давностью заболевания 3-4 года из онкологического диспансера г.Гюмри. Для выделения и очистки Nox из ЭМ и экзосом сыворотки донорской крови и крови пациентов носителей РЖ использовали целлолозу DE-52 («Whatman», Англия) и сефадекс DEAE A-50 («Pharmacia», Швеция). Для определения  $O_2^-$ -продуцирующей активности Nox были использованы нитротетразолиевый синий (НТС), феназинметасульфат (ФМС), пиррофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH («Sigma», США). Для восстановления Nox использовали кристаллы дитионита натрия («Sigma», США). Для оценки ферриHb-восстанавливающей активности Nox, а также для комплексообразования гемоглобина с изоформами Nox был использован электрофоретически гомогенный ферриHb, выделенный из цитозоля эритроцитов донорской крови. При ионообменной хроматографии и гель-фильтрации были использованы стеклянные колонки с фильтрами размером  $2 \times 10$  см и  $3 \times 80$  см соответственно, а также центрифуги K-24 и K-70 («Veb MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf», Германия) и ультратермостат (Германия). Оптические спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Hitachi 2000 (Япония) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с использованием метода вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности "p".

**Выделение и очистка Nox из эритроцитарных мембран.** Эритроцитарные мембраны (5 мл эритроцитов) промывали сначала 0,04 М калий фосфатным буфером (КФБ, 1:200 об/об), затем водой (1:500 об/об) и после центрифугирования в течение 10 мин при

10.000×g, осадок ЭМ гомогенизировали в воде (1:20 об/об). После инкубации смеси ЭМ с 5  $\mu$ М ферриHb при pH 7,4 в течение 2 ч и центрифугирования супернатант разбавляли водой (в 30 раз) и подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52, из которой ферриHb элюировали 0,004 М, а Nox - 0,1 М КФБ [1].

**Выделение и очистка экстрацеллюлярной Nox из экзосом сыворотки крови.** После осаждения эритроцитов центрифугированием крови при 6000×g, 10 мин сыворотку отделяли и инкубировали с 5  $\mu$ М ферриHb в аналогичных условиях. После тридцатикратного разбавления водой инкубационного раствора его подвергали ионообменной хроматографии на сефадексе DEAE A-50, уравновешенном 0,001 М КФБ. Из этой колонки ферриHb элюировали 0,004 М, а экстрацеллюлярную Nox (eNox) 0,03 М КФБ. После разбавления элюата водой (в 20 раз) eNox подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52, уравновешенной 0,001 М КФБ. Из этой колонки eNox была элюирована также 0,03 М КФБ [1].

**Определение NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей активности изоформ Nox.** NADPH-зависимую  $O_2^-$ -продуцирующую активность изоформ Nox определяли с помощью НТС путем вычисления процента оптической плотности, образующегося в результате восстановления НТС супероксидными радикалами формазана при 560 нм. За единицу NADPH-зависимой  $O_2^-$ -продуцирующей активности Nox принимали количество белка (плотность оптического поглощения  $\beta$ -полосы при 530 нм), стимулирующего образование формазана на 50%. Удельную NADPH-зависимую  $O_2^-$ -продуцирующую активность Nox определяли в расчете на 1 г ткани или 1 мл сыворотки и 1 мл цитозоля [4].

**Определение ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox.** ФерриHb-восстанавливающую активность изоформ Nox выявляли кинетическим методом путем определения снижения плотности оптического поглощения  $\alpha$ -полосы ферриHb под влиянием Nox. За единицу ферриHb-восстанавливающей активности Nox принимали количество белка, вызывающее снижение плотности максимального оптического поглощения  $\alpha$ -полосы ферриHb до 0,05 оптических единиц в течение 30 мин при 37°C. Удельную ферриHb-восстанавливающую активность изоформ NADPH оксидаз определяли в расчете на 1 г ткани, 1 мл сыворотки и 1 мл цитозоля [4].

### Результаты и обсуждение.

Для выделения изоформ Nox из ЭМ и экзосом сыворотки донорской крови и крови пациентов с РЖ было использовано открытое недавно явление комплексообразования ферриHb с изоформами Nox [5]. Фактически ферриHb, связываясь с локализованной на поверхности ЭМ или мембран наночастиц (экзосом), Nox переводит последнюю из гетерогенной в гомогенную (растворимую) фазу. При этом ассоциированный с Nox ферриHb отделяется от Nox ионообменной хроматографией на целлюлозе DE-52 (для Nox из ЭМ) и DEAE A-50 (для eNox из экзосом сыворотки). Форма и максимумы оптических поглощений Nox и eNox крови пациентов с РЖ практически не отличаются от таковых донорской крови: в окисленном состоянии имеются характерные для Nox (цитохрома  $b_{558}$ ) максимальные оптические поглощения при 560 нм, 530 нм и 412 нм, а в восстановленном дитионитом натрия состоянии – при 558 нм, 540 нм и 418 нм. Для eNox имеется характерное поглощение при 485 нм. Однако степень отщепления (рилизинг) Nox из ЭМ при РЖ ниже таковой у Nox из ЭМ донорской крови ( $14,3 \pm 2,2$  %,  $p < 0,05$ ) (рис.1а). Возможно, это связано с повышением липидной пероксидации этих мембран и изменением их текучести [13,9]. Наоборот, степень отщепления eNox из экзосом сыворотки крови больных с РЖ увеличена на  $17,4 \pm 2,5$  %,  $p < 0,05$ ) (рис.1б). По сравнению с сывороткой донорской крови в сыворотке крови пациентов с РЖ имеются следы ферриHb ( $A_{565} = 0,23$ ) из-за ослабления ЭМ, частичного гемолиза эритроцитов и выхода гемоглобина в сыворотку. Этот гемоглобин может инициировать выход eNox из экзосом в растворимую фазу [5]. В результате комплексообразования с изоформами Nox

наблюдается изменение изоэлектрической точки ферриHb и последний осаждается вместе с Nox на целлюлозе DE-52 или DEAE A-50 (ферригемоглобин является гемопотеином основного характера и в нативном состоянии осаждается только на целлюлозе CM-52). В данном случае уровень комплекса ферриHb с Nox прямо пропорционален уровню Nox или eNox (рис.2 а,б). По сравнению с показателями донорской крови NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая активность Nox и eNox повышена на  $22,6 \pm 3,3$  % и  $31,3 \pm 4,2$  % ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) соответственно. Однако, по сравнению с показателями донорской крови, ферриHb-восстанавливающая активность Nox и eNox при РЖ снижена на  $12,6 \pm 1,1$  % и  $18,1 \pm 2,4$  % ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) соответственно.

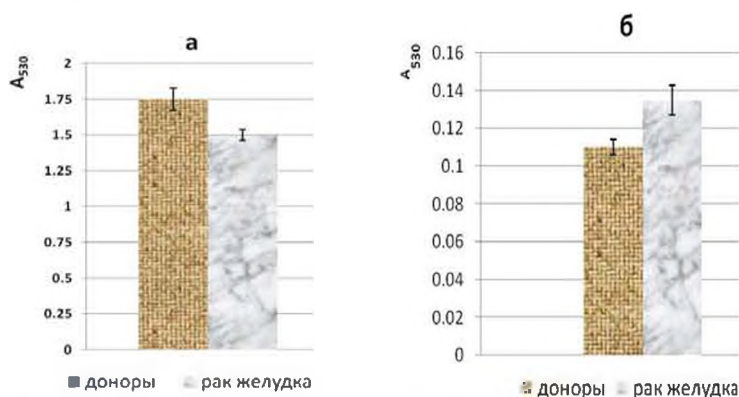


Рис.1. а - Расчетное удельное содержание Nox (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм 1 мл Nox, полученной из 1 мл эритроцитов), отщепленной из ЭМ донорской крови и ЭМ крови пациентов, носителей рака желудка ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). б - Расчетное удельное содержание eNox (плотность максимального оптического поглощения при 530 нм 1 мл eNox, полученной из 1 мл сыворотки крови), отщепленной из экзосом сыворотки донорской крови и экзосом сыворотки крови пациентов, носителей рака желудка ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ).

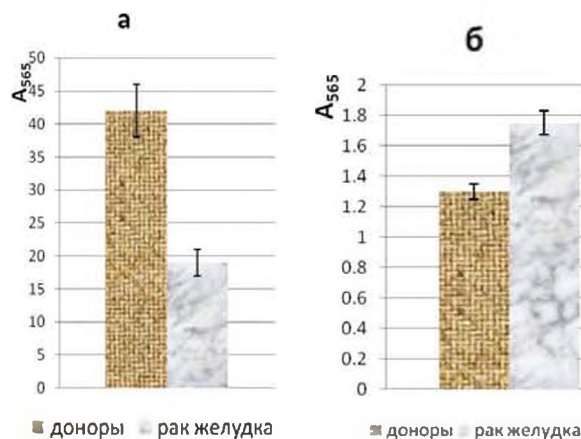


Рис.2. а - Расчетное удельное содержание ферритина, полученного из комплексного соединения ферритина с Nox ЭМ (плотность максимального оптического поглощения при 565 нм 1 мл ферритина, полученного из 1 мл эритроцитов), выделенного из эритроцитов донорской крови и эритроцитов крови пациентов, носителей рака желудка ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). б - Расчетное удельное содержание ферритина полученного из комплексного соединения между eNox из экзосом сыворотки донорской крови и экзосом сыворотки крови пациентов, носителей рака желудка ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ).

Таким образом, при раке желудка человека дестабилизация ЭМ ассоциирована с уменьшением релизинга Nox из ЭМ. При этом наблюдается стимуляция отщепления eNox из экзосом сыворотки крови на фоне повышения  $O_2^-$ -продуцирующей и снижения ферриHb-восстанавливающей активности этих ферментов. Как результат таких изменений происходит снижение кислородного гомеостаза и нарушения окислительно-восстановительного статуса ЭМ и экзосом.

*Работа осуществлена при финансовой поддержке  
гранта государственного комитета по науке  
Республики Армения 13-1F 279.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Միմոնյան Ռ.Մ., Միմոնյան Գ.Մ., Միմոնյան Մ.Ա. Կենսաիմունոլոգիայի և ՆԱԴՓH-օքսիդազի (Nox) իզոմերների արտազատման եղանակ: ՀՀ Մտավոր սեփականության գործակալություն, գյուտի արտոնագիր N2818 A, 2014 թ.
2. Алексанян М.К., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Алексанян С.С., Симонян М.А. Экстрацеллюлярная NADPH оксидаза из асцитной карциномы Эрлиха и дисбаланс между прооксидантными и антиоксидантными металлопротеинами клеток тканей мышей. Медицинская наука Армении НАН РА., LI, 4. с. 46-57. 2011.
3. Алексанян М.К., Симонян Г.М., Алексанян Серг. С., Симонян Р.М., Ширинян В.А., Алексанян С.С., Симонян М.А. Повышение уровня экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в асцитной карциномы легких человека. Вопросы теоретической и клинической медицины. 15, 1 (68), с. 10-12, 2012.
4. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А., Секоян Э.С. Влияние низкоспинового гелий-неонового лазера на супероксид-продуцирующую и метHb-восстанавливающую активность цитохрома  $b_{558}$  эритроцитарных мембран. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 4, с. 9-11, 2007.
5. Симонян Р.М., Галоян К.А., Симонян Г.М., Хачатрян А.Р., Бабаян М.А., Оксюзян Г.Р., Симонян М.А. Ферригемоглобин индуцирует релизинг NADPH оксидазы из клеток мозговой ткани *ex vivo*: подавления этого процесса галармином. Нейрохимия, 30(3), с.1-5, 2013.
6. Admyre C., Johansson S.M., Qazi K.R., Filen J.-J., Lahesmaa R., Norman M., Neve EPA, Scheynius A., Gabrielsson S. Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J Immunol.*, 179, p.1969-1978. 2007.
7. Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.*, 17, p. 879-887, 2005.
8. Oberley L.W., Buettner G.R. Role of SOD in cancer. *Cancer Res.*, 39, p.1141-1149. 1979.
9. Ribarov S.R., Benov L.C., Marcova V.I. Possible contribution of oxyhemoglobin to the iron-induced hemolysis simultaneous effect of iron and hemoglobin on lipid peroxidation. *Blut. Apr*; 46(4), p.5
10. Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y., Tominaga K., Sekiyama A., Teshima-Kondo S. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.*, 8(9-10), p1573-1582. 2006.
11. Simonyan R.M., Simonyan G.M., Oxuzyan G.R., Alexanyan S.S., Simonyan M.A. The hemoglobin induces releasing of the extracellular NADPH oxidase in mammalian blood serum and fluids of ascitic carcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Issues in theoretical and clinical medicine*, 17(2), p.16-21, 2014.



12. *Tominaga K., Kawahara T., Sano T., Toida K., Kuwano Y., Sasaki H., Kawai T., Teshima-Kondo S., Rokutan K.* Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic Biol Med.*, 43(12), p.1627-38. 2007.
13. *Trotta R.J., Sullivan S.G., Stern A.* Lipid Peroxidation and Haemoglobin Degradation in Red Blood Cells, Exposed to t-butyl Hydroperoxide. *Biochem.J.*, 204, p. 405-415. 1982
14. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (9), p.1428-1459. 2002.
15. *Wolfers J., Lozier A., Raposo G., Regnault A., Théry C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.*, 7, p.297-303, 2001.



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАРДИОАКТИВНОГО НЕЙРОГОРМОНА ГИПОТАЛАМУСА НА ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ

Р.М. СРАПИОНЯН, Ф.М. СААКЯН, З.Х. ПАРОНЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА  
srapionyanrm@rambler.ru

На изолированном перфузируемом по Лангендорфу сердце крысы кардиоактивный нейрогормон НГ<sub>3а</sub> при действии в концентрации  $2.10^{-5}$  г/мл значительно уменьшал скорость коронарного протока. Эффект сохранялся в течение 5-10 мин, после чего развивалась вторая фаза, выражавшаяся в увеличении скорости. Максимальный эффект составил 122 % по сравнению с контролем. Вторая фаза эффекта возникала через 30-45 мин после введения НГ<sub>3а</sub>. Достоверного влияния на частоту сердечных сокращений НГ<sub>3а</sub> не оказывал, однако в 7,3 % случаев регистрировалась брадиаритмия на фоне максимального увеличения скорости коронарного протока. Делается вывод о прямом влиянии НГ<sub>3а</sub> на коронарный кровоток.

*Кардиоактивный нейрогормон - коронарный проток - изолированное сердце*

Ըստ Լանգենդորֆի հեղուկացման եկթարկված առնետի մեկուսացված սրտի վրա  $2.10^{-5}$  գ/մլ կոնցենտրացիայով նեյրոհորմոն НГ<sub>3а</sub>-ի ազդեցությամբ զգալիորեն դանդաղում է կորոնար հոսքի արագությունը: Ազդեցությունը պահպանվում է 5-10 րոպե, այնուհետև զարգանում է երկրորդ փուլը, որն արտահայտվում է արագության մեծացմամբ: Ստուգիչի հետ համեմատած առավելագույն ազդեցությունը կազմում է 122 %: Ազդեցության երկրորդ փուլը առաջանում է НГ<sub>3а</sub>-ի ներարկումից 30-45 րոպե հետո: НГ<sub>3а</sub>-ն սրտի կծկումների հաճախականության վրա հավաստի ազդեցություն չի գործում, սակայն կորոնար հոսքի առավելագույն ավելացման դեպքում 7.3 %-ի մոտ գրանցվում է բրադիարիթմիա: Կարելի է եզրակացնել, որ НГ<sub>3а</sub>-ն ուղղակիորեն ազդում է կորոնար հոսքի վրա:

*Կարդիոակտիվ նեյրոհորմոն - կորոնար հոսք - մեկուսացված սիրտ*

On the isolated perfused by Langendorf rat heart the cardioactive hypothalamic neurohormone NG<sub>3a</sub> ( $2.10^{-5}$ g/ml) significantly decreased the coronary flow rate, the effect persisted during 5-10 min, after that the second phase appeared which was expressed by the increase of coronary flow rate. The maximum effect was 122 % compared with control. The second phase appeared in 30-45 min after infusion of NG<sub>3a</sub>. NG<sub>3a</sub> did not influence the heart rate, but sometimes (7,35 cases) during the maximum increase of coronary flow the bradiarhythmia was registered. It was been concluded that NG<sub>3a</sub> influences directly the coronary vessels.

## Cardioactive neurohormone - coronary flow - isolated heart

Открытие новых пептидных и полипептидных регуляторных систем и подробное их изучение приводит к пересмотру традиционных представлений о генезе сердечно – сосудистых заболеваний. Результаты многолетних исследований [2, 6], более чем 40 лет тому назад открытых нами в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса трех белок – гормональных комплексов (БГК), привели к действительности гипотезы о том, что эти БГК являются теми биохимическими системами, которые могут осуществить химическую регуляцию метаболизма и функций мозга и ряда висцеральных органов, в особенности сердца [3]. По типу связывания с кардиоактивными нейрогормонами "С", "Г", "К" комплексы условно обозначены как "БНС", "БНГ" и "БНК". Наиболее изученным из них является нейрогормон "НС", оказывающий активное регуляторное влияние на ряд метаболических процессов в сердце [1]. Исследование биохимической и физиологической активности других кардиоактивных нейрогормонов, в частности гормонов группы "НГ" (НГ<sub>3</sub> и НГ<sub>5</sub>), привело к выводу о том, что они также существенно изменяют биохимические процессы в миокарде и влияют на функциональное состояние сердца, проявляя высокую активность физиологического действия (расширение коронарных сосудов, стабилизация кровяного давления, усиление кровотока, повышение проницаемости капилляров). При этом эффекты развивались с относительно небольшим латентным периодом (около 10 мин) и достигали 150-200 % от исходного значения кровотока [4].

С целью уточнения этих данных мы предприняли эксперименты по исследованию действия нейрогормона НГ<sub>3а</sub> на изолированном сердце крысы, что позволило нам проводить прямую регистрацию изменений коронарного кровотока при одновременной регистрации электрограммы сердца.

**Материал и методика.**

Опыты проводили на изолированном перфузированном по Лангендорфу сердце крыс (25 беспородные самцы, масса 180-200г.). Крысам за 20 мин до опыта вводили гепарин 500 Ед внутрибрюшинно. Животных забивали прерыванием позвоночника в шейной области, вскрывали грудную полость, изолировали сердце и начинали ретроградную коронарную перфузию через канюлю, введенную в дугу аорты модифицированным раствором Кребса – Хензеляйта при рН 7,3-7,4, t 36-37°C, давлении 100 см вод. ст. Скорость коронарного протока исходно была равна в среднем 12,5 мл/мин.

После 30 мин адаптации начинали регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ). Запись ЭКГ вели на скорости 50 мм/с. Одновременно с помощью *частотомера 43-33* проводили автоматический счет частоты сердечных сокращений. Оценку коронарного перфузионного протока проводили в мл/мин. Исследуемое соединение вводили со скоростью 1мл/1мин в течение 1 мин в коронарный проток через термостатируемый и оксигенируемый резервуар объемом 10 мл. В опытах использован НГ<sub>3а</sub> в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  г/мл [5].

Статистическую обработку данных проводили с применением непараметрического критерия Манна - Уитни U. Уровень значимости  $p < 0,01$  считали достоверным по сравнению с контролем.

**Результаты и обсуждение.**

Внутрикоронарное введение нейрогормона НГ<sub>3а</sub> в начальный момент вызывало падение скорости коронарного протока (СКП) в среднем на 55% ( $p < 0,05$ ); первая фаза эффекта сохранялась в течение 5-10 мин, после чего СКП возвращалась к исходному значению. Через 30-45 мин после введения развивалась вторая фаза эффекта, выражавшаяся в значительном увеличении СКП. Максимальный эффект достигал 122 % по сравнению с контрольными опытами, в которых вместо НГ<sub>3а</sub> осуществляли внутрикоронарное введение раствора Кребса-

Хензеляйта в том же объеме и с той же скоростью, что и введение НГ<sub>3а</sub> ( $p < 0,01$ ). Восстановление СКП после развития второй фазы эффекта наблюдали через 100-120 мин после введения.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показана способность гипоталамического нейrogормона НГ<sub>3а</sub> оказывать прямое влияние на коронарный проток. Сопоставление данных, полученных *in vivo* и *in vitro*, показывает, что в обоих случаях выявляется выраженный коронародилататорный эффект, сохраняющийся в течение 3-х часов. Однако в опытах на изолированном сердце, помимо коронародилатации, возникает и первичная констрикция; кроме того, при минимальной дилатации коронарных сосудов наблюдается в ряде случаев брадиаритмия. Все эти эффекты, очевидно, связаны с прямым влиянием НГ<sub>3а</sub> на коронарные сосуды и на пейсмейкер сердца [7].

Ранее нами был применен радиоиммунологический анализ, позволивший раскрыть принципиально новые возможности в изучении функциональных особенностей нейроспецифического БНГ [8] и выявить факты, подтверждающие непосредственное отношение к рубцеванию зоны некроза при инфаркте миокарда, улучшению кровоснабжения сердца.

Вышеизложенный спектр исследований позволяет не только выяснить регуляторные функции нейrogормона НГ<sub>3а</sub>, открывая новые этапы в его теоретической трактовке, но и создает принципиально новые возможности в поисках путей направленной коррекции сердечно-сосудистых заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А.А., Срапионян Р.М., Саакян Ф.М. Химия и функция биоактивных белков магноцеллюлярных ядер гипоталамуса. Тезисы Докл. СССР-Италия симпозиум "Макромолекулы в функционирующей клетке". Пущино, с.22, 1980.
2. Срапионян Р.М., Саакян С.А., Саакян Ф.М., Галоян А.А. О специфических белках гипоталамуса. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм ССР, 13, с.67-68, 1978.
3. Срапионян Р.М., Галоян А.А., Мисирян С.С. Новые данные о белках сердца, рецептирующих коронарорасширяющие начала гипоталамуса. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм ССР, 10, с.122-127, 1975.
4. Срапионян Р.М., Джамбазян Т.А., Галоян А.А. Об образовании коронарорасширяющих соединений из белков-носителей гипоталамуса. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм ССР, 6, с.157-160, 1970.
5. Срапионян Р.М. Нейроспецифические белок-гормональные комплексы. Успехи физиол. наук, 27 (1), с.21-31, 1997.
6. Galoyan A.A., Srapionian R.M. Protein-hormonal complexes of the hypothalamus, as neurochemical systems of regulation. J. of Neurochem. Res., 8 (12), pp.1511-1535, 1983.
7. Srapionian R.M., Sahakian S.A., Lelekowa T.V. et al. Effect of neurospecific cardioactive protein-hormonal complexes on lymphatic vessels and vas deferens contraction in rat. 16-th Biennial Meet. ISN, Boston USA, J. of Neurochem., 69, P.S. 201D, 1997.
8. Srapionian R.M., Paronian Z.Kh., Abelian J.G. et al. Role of cardiotropic protein-hormonal complexes in the regulation of hemostasis. Neurochem. Journal. 25 (4), pp.321-322, 2008.



Biolog. Journal of Armenia, Supplement 1 (66), 2014

## ASSOCIATION OF THE COMPLEXIN-2 GENE RS1366116 POLYMORPHISM WITH ISCHEMIC STROKE

A.S. STEPANYAN, S.A. ATSHEMYAN, A.S. BOYAJYAN

*Institute of Molecular Biology NAS RA  
imb@sci.am*

Glutamate-induced excitotoxicity is considered one of the major mechanisms involved in the pathogenesis of ischemic stroke (IS), a severe acute neurological complex disorder with polygenic inheritance. However, molecular level alterations responsible for IS-associated excitotoxicity are yet unclear. Complexins represent a family of proteins contributing to the modulation of neurotransmitter release and maintenance of synaptic plasticity. Recent study demonstrated upregulation of complexin-2 in the ischemic brain that may suggest its implication to synaptic malfunction in IS. In the present work we evaluated the potential association of the complexin-2 gene (*CPLX2*) rs1366116 and rs3892909 single nucleotide polymorphisms (SNPs) with IS. For this purpose, genomic DNA samples of 172 patients with IS and 225 healthy subjects of Armenian nationality were genotyped for the selected *CPLX2* gene SNPs using polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Data were analyzed by Pearson's  $\chi^2$  test. The obtained results demonstrated positive association of the *CPLX2* gene rs1366116 SNP and IS and absence of any association between this disorder and the rs3892909 SNP of the *CPLX2* gene. Our finding suggests that T minor allele of the rs1366116 SNP of the *CPLX2* gene may be considered as a risk factor of IS.

### *Ischemic stroke - complexin-2 - single nucleotide polymorphisms - genotyping*

Իշեմիկ կաթվածը (ԻԿ) պոլիգեն, սուր նյարդային համալիր ծանր հիվանդություն է, որի կարևորագույն պատճենաձևերից է հանդիսանում գլյուտամատոքսիկ խթանված էքսայտոտոքսիկությունը: Վերջինիս համար պատասխանատու խանգարումների մոլեկուլային մեխանիզմները դեռևս հայտնի չեն: Կոմպլեքսինները սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչ սպիտակուցներ են, որոնք մասնակցում են նեյրոմիջնորդանյութերի արտազատմանը: Համաձայն վերջին շրջանի հետազոտությունների արդյունքների, ԻԿ ժամանակ ուղեղի հյուսվածքներում բարձրանում է կոմպլեքսին-2 սպիտակուցի մակարդակը, ինչը վկայում է այս հիվանդությանը բնորոշ սինապտիկ թերֆունկցիայի մեջ նշված սպիտակուցի հնարավոր ներգրավվածության մասին: Մեր հետազոտության խնդիրն էր հանդիսացել ուսումնասիրել կոմպլեքսին-2 սպիտակուցի գենի (*CPLX2*) rs1366116 և rs3892909 եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմների հնարավոր ասոցիացումը ԻԿ հետ հայկական պոպուլյացիայում: Այդ նպատակով կատարվել է 172 հիվանդների և 225 առողջների PCR-SSP մեթոդով ԴՆԹ նմուշների գենոտիպավորում՝ ըստ նշված պոլիմորֆիզմների: Ստացված տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է Պիրսոնի  $\chi^2$  թեստով: Համաձայն ստացված արդյունքների, *CPLX2* գենի rs1366116 պոլիմորֆիզմը դրական ասոցիացված է ԻԿ հետ, իսկ *CPLX2* գենի rs3892909 պոլիմորֆիզմի և ԻԿ հետ ասոցիացիան բացակայում է: Տվյալ հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ *CPLX2* գենի rs1366116 պոլիմորֆիզմի T միևնույնիսկ ալելի ժառանգումը բարձրացնում է ԻԿ-ի զարգացման ռիսկը:

*ԴՆԵՄԻԿ Կաթված - կոմպլեքսին-2 - եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմներ - գենոտիպավորում*

Глутаматная эксайтотоксичность рассматривается как важнейший патогенетический механизм ишемического инсульта (ИИ) - тяжелого острого комплексного неврологического заболевания с полигенным типом наследования. Однако до настоящего времени неясно какие нарушения на молекулярном уровне ответственны за ассоциированную с ИИ эксайтотоксичность. Комплексины представляют семейство белков, участвуют в модуляции высвобождения нейротрансмиттеров и поддержании синаптической пластичности. Согласно литературным данным в недавно проведенных исследованиях было продемонстрировано сверхпродукция комплексина-2 в ткани головного мозга при ишемии, что может свидетельствовать о его вовлечении в синаптическую дисфункцию при ИИ. Целью настоящей работы было изучение возможной ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов rs1366116 и rs3892909 гена комплексина-2 с ИИ. С этой целью образцы геномной ДНК 172 больных ИИ и 225 здоровых лиц армянской национальности были генотипированы методом полимеразной цепной реакции со специфичными к последовательности праймерами (PCR-SSP). Статистический анализ данных проводился согласно критерию  $\chi^2$  Пирсона. Проведенное исследование показало наличие положительной ассоциации между rs1366116 полиморфизмом гена *CPLX2* и ИИ и отсутствие какой-либо ассоциации между этим заболеванием и rs3892909 полиморфизмом гена *CPLX2*. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что наследование Т минорной аллели rs1366116 полиморфизма гена *CPLX2* повышает риск развития инсульта.

*Ишемический инсульт - комплексин-2 - однонуклеотидные полиморфизмы - генотипирование*

### Introduction.

Stroke is a leading cause of death and adult disability in the developed world, and there is no effective treatment for this disorder. Ischemic stroke (IS) is a polygenic complex disorder caused by gene-environmental interactions, which induce different pathophysiological processes [6]. Identification of whole complex of genetic variations associated with IS could sufficiently enlarge our knowledge on molecular targets for stroke therapy and prevention of its complications.

Glutamate-induced excitotoxicity is considered one of the major mechanisms involved in the pathogenesis of IS. An increase in intracellular calcium following over-activation of glutamate receptors leads to excitotoxicity and tissue injury [8].  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) protein-dependent synaptic vesicle exocytosis process [7]. However, molecular level alterations responsible for IS-associated *excitotoxicity* are yet unclear. Complexins represent a family of proteins contributing to the modulation of neurotransmitter release and maintenance of synaptic plasticity [11]. These proteins have been characterized as being responsible for the regulation of SNARE-mediated fusion [10]. Promising studies have indicated that complexins bind in an antiparallel  $\alpha$ -helical conformation to the groove between synaptobrevin and syntaxin and stabilizes the interface between these two SNAREs that bears the repulsive forces between the apposed membranes [4]. Recently it has been reported that inhibition of the SNARE pathway attenuated damage after stroke suggesting that complexin-2 is a central target molecule that links NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to glutamate-mediated neuronal excitotoxicity in IS [13]. Also, upregulation of complexin-2 in the

ischemic brain has been demonstrated [13] that provides further evidence on implication of this protein to synaptic malfunction in IS.

The present study was designed to investigate potential association of the functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) of gene encoding complexin-2 (CPLX2) with IS in an Armenian population.

### Materials and Methods.

**Study population.** In total, 172 patients with first episode IS (males/females: 90/82; mean age  $\pm$ SD:  $50 \pm 9.7$  years) and 225 healthy subjects (males/females: 154/71; mean age  $\pm$ SD:  $42.6 \pm 9.2$  years) were enrolled in this study. All subjects were unrelated Caucasians of Armenian ancestry. Patients were hospitalized in the Medical Clinic N2 of the Yerevan State Medical University. Diagnosis of IS was based on clinical history and neurological examination and was confirmed by brain computer tomography (CT) imaging and basal laboratory tests. Stroke severity was scored using the National Institutes of Health Stroke Scale. Among IS patients involved in this study 38 had cardioembolic stroke, and 134 - large vessel atherothromboembolic stroke. Among IS patients 89 had hyperlipidemia, 70 had arterial hypertension, 32 had atrial fibrillation, and 53 had coronary artery disease; 63 patients were nicotine-dependent (cigarette smokers), and 34 were alcohol consumers; 86 patients had positive family history of IS (54 -maternal heredity, 30 - paternal heredity, 2 - both). Healthy subjects (controls) without family history of IS and myocardial infarction were recruited among the blood donors of the Erebouni Medical Center of the Ministry of Health of the Republic of Armenia (MH RA) and had no history of previous ischemic cerebrovascular event. Controls had no serious medical disorders, including coronary artery disease, atrial fibrillation, arterial hypertension, and hyperlipidemia, or treatment during the past 12 months. At the time of blood sampling they do not have symptoms of IS or a transient ischemic attack. No special studies have been performed to assess the progress of atherosclerotic process in controls. Exclusion criteria for all subjects include past or present history of neuropsychiatric disorders, metabolic disorders, myocardial infarction, oncological and immune system diseases. All subjects or their legal representatives gave their informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethical Committee of the Institute of Molecular Biology NAS RA (IRB #00004079).

**Collection of blood samples and extraction of genomic DNA.** About 5 ml of venous blood was collected from each study participant by venipuncture and transferred to EDTA-containing tubes. Blood samples of IS patients were collected on days 1-4 of stroke onset. Genomic DNA was isolated from fresh blood samples according to the standard phenol-chloroform method and stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  until further use [12].

**Genotyping of the CPLX2 gene rs1366116 and rs3892909 SNPs.** All DNA samples were genotyped for CPLX2 gene rs1366116 and rs3892909 SNPs using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) under earlier described conditions [3]. All primers for the PCR-SSP were designed using the genomic sequences in the GenBank database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The primers sequences were as follows:

1. CPLX2 rs1366116: reverse 5'-ATG-TGT-AGG-AAA-ATG-GCT-TCG-3' for standard C allele, reverse 5'-ATG-TGT-AGG-AAA-ATG-GCT-TCA-3' for minor T allele, and constant: forward 5'-CAA-TGG-CCT-CTG-ACT-GGT-G-3';
2. CPLX2 rs3892909: forward 5'-GGT-GAG-GCT-GCT-GTC-TGC-3' for standard C allele, forward 5'-GGT-GAG-GCT-GCT-GTC-TGT-3' for minor T allele, and constant: reverse 5'-CTG-CTT-CAT-GAC-GAA-GTC-CA-3'.

The presence/absence of allele-specific amplicons was visualized by electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

**Statistical analysis.** Distribution of genotypes for the rs1366116 and rs3892909 SNPs were checked for correspondence to Hardy-Weinberg equilibrium. To reveal a potential association of these SNPs with IS, their genotype, allele, and minor allele carriage frequencies in patients and controls were compared. The significance of differences in the mentioned parameters between the study groups was determined using Pearson's  $\chi^2$  test. The odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI), and Pearson's p value were calculated. Statistical power of the present study was assessed as described earlier [9]. All tests were two-sided with 95% significance level ( $p < 0.05$ ). P

values  $<0.05$  after adjustment by Bonferroni multiple correction approach were considered significant.

### Results.

To assess potential association between the *CPLX2* gene rs1366116 and rs3892909 SNPs and IS, genomic DNA samples of patients and controls were genotyped for the selected polymorphisms. The genotype frequencies of the selected SNPs followed the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). Estimated genotype and allele frequencies of the *CPLX2* gene rs1366116 and rs3892909 SNPs in controls were similar to those reported for European population in public genetic database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). The distributions of the rs1366116 and rs3892909 variants in both study groups are presented in Table 1. Regarding the rs1366116 SNP, there was detected a significant increase in the frequency of T minor allele ( $p=8.8E-5$ ,  $p_{\text{corr}}=1.7E-4$ , OR =1.8, 95% CI 1.343-2.434) and carriage of this allele ( $p=0.015$ ,  $p_{\text{corr}}=0.03$ , OR=0.6, 95% CI 0.4-1) in patients compared with controls. Accordingly, the carriers of *CPLX2* rs1366116\*T minor allele were overrepresented in patients compared to controls. Statistical power of this study, indicating the difference in the allele frequency of the rs1366116 SNP between the patients and controls, was 99.54%.

No association between the rs3892909 SNP and IS was found.

**Table 1.** Genotype, allele and minor allele carriage frequency distributions (FD) of the *CPLX2* gene rs1366116 and rs3892909 SNPs in IS patients and controls.

| SNP ID    | Genotype (FD, %)              |                               | Allele (FD, %)   |                  | $P_{\text{nominal}}$<br>$P_{\text{corrected}}$ | Carriage (FD, %) |          | $P_{\text{nominal}}$<br>$P_{\text{corrected}}$ |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------------------------------------|------------------|----------|------------------------------------------------|
|           | IS<br>(n=172)                 | Controls<br>(n=225)           | IS               | Controls         |                                                | IS               | Controls |                                                |
|           |                               |                               |                  |                  |                                                |                  |          |                                                |
| rs1366116 | CC (41)<br>CT (36)<br>TT (23) | CC (53)<br>CT (38)<br>TT (9)  | C (59)<br>T (41) | C (72)<br>T (28) | 8.8E-5<br>1.7E-4                               | (59)             | (47)     | 0.015<br>0.030                                 |
| rs3892909 | CC (23)<br>CT (49)<br>TT (28) | CC (20)<br>CT (52)<br>TT (28) | C (47)<br>T (53) | C (46)<br>T (54) | 0.7<br>1.4                                     | (77)             | (80)     | 0.52<br>1.04                                   |

### Discussion.

Recent report have indicated that gene silencing of complexin-2 ameliorated cerebral injury as evidenced by reduced infarction volume, neurological deficit, and neuron necrosis accompanied by decreased glutamate levels [13]. The present study demonstrated that the *CPLX2* rs1366116\*T minor allele is positively associated with IS in Armenian population. Interestingly, previous studies performed in our laboratory demonstrated associated of this SNP with schizophrenia and posttraumatic stress disorder in Armenian population [1, 2], which like IS are characterized by defects in synaptic plasticity [5]. All together these observations emphasize the important role of complexin-2, in particular, and genetic factors, in general, in development of pathogenic alterations relative to synaptic-plasticity.

Since the present observation refers to one given population (Armenian), the results should be replicated in other populations/ethnic groups. Another limitation of the present study is relatively small sample size (172 patients and 225 controls).



### Conclusion.

Our finding nominates the minor T allele of the *CPLX2* gene rs1366116 SNP as a risk factor for IS at least in Armenian population.

### Acknowledgment.

The authors express their gratitude to the administration and medical staff of the Medical Clinic N2 of the Yerevan State Medical University and the Erebouni Medical Center MH RA as well as to all subjects involved in this study.

### REFERENCES.

1. *Avetyan D.* Changes in apoptotic rate and synaptic plasticity in patients with posttraumatic stress disorder. *El J Nat Sci*, 2 (21), 70-73, 2013.
2. *Boyajyan A., Chavushyan A., Zakharyan R., Mkrtchyan G., Atshemyan S.* Implication of genetic polymorphisms and changes in expression levels of proteins regulating neuronal plasticity and apoptosis in schizophrenia disorder. *Eur Psychiatry*, 28(1), 43, 2013.
3. *Bunce M., O'Neill C.M., Barnardo M.C., Krausa P., Browning M.J., Morris P.J., Welsh K.I.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 46(5), 355-67, 1995.
4. *Chen X., Tomchick D.R., Kovrigin E., Arac D., Machius M., Sudhof T.C., Rizo J.* Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*, 33, 397-409, 2002.
5. *Font M.A., Arboix A., Krupinski J.* Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev*, 6(3), 238-244, 2010.
6. *Hassan A., Markus H.S.* Genetics and ischaemic stroke. *Brain*, 123 (9), 1784-812, 2000.
7. *Jahn R., Scheller R.H.* SNAREs—engines formembranefusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 631-643, 2006.
8. *Kristián T., Siesjö B.K.* Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29, 705-718, 1998.
9. *Lalouel J.M., Rohrwasser A.* Power and replication in case-control studies. *Am J Hypertens*, 15, 201-205, 2002.
10. *Maximov A., Tang J., Yang X., Pang Z.P., Sudhof T.C.* Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science*, 323, 516-521, 2009.
11. *Pabst S., Hazzard J.W., Antonin W., Südhof T.C., Jahn R., Rizo J., Fasshauer D.* Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *J Biol Chem*, 275(26), 2000.
12. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., chapter 8/ Ney York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
13. *Ziying Wang, Xinbing Wei, Kang Liu, Xiumei Zhang, Fan Yang, Hongyu Zhang, Yeteng He, Tianfeng Zhu, Fengli Li, Weichen Shi, Yan Zhang, Huiyan Xu, Jiang Liu, FanYi* NOX2 deficiency ameliorates cerebral injury through reduction of complexin II-mediated glutamate excitotoxicity in experimental stroke, *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 942-951, 2013.

### Abbreviations

*CPLX2* - complexin-2  
 IS - ischemic stroke  
 MH RA - Ministry of Health of the Republic of Armenia  
 NAS RA - National Academy of Sciences of the Republic of Armenia  
 OR - odds ratio  
 PCR-SSP - polymerase chain reaction with sequence-specific primers  
 SNARE - soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor  
 SNP - single nucleotide polymorphism



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ГЛИКОГЕН ФОСФОРИЛАЗЫ НЕЙРОПЕПТИДОМ ПБП-1. РОЛЬ цАМФ И ИОНОВ $Ca^{2+}$ В ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Л.П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН, Л.А. ЕРАНОСЯН, Л.Н. АРАКЕЛЯН,  
С.Г. ЧАИЛЯН

*Институт биохимии им. Г.Букятына НАН РА  
luizaycr@gmail.com*

С помощью метода FRET (ForsterResonanceEnergyTransfer) определялись некоторые биохимические механизмы взаимосвязи между сигнальными пептидами головного мозга (в частности ПБП-1) и системой вторичных посредников (цАМФ и  $Ca^{2+}$ ). Используя FRET-индикатор Ipac1-camps, разработанный специально для цАМФ, количественные изменения цАМФ можно отслеживать в реальном времени на уровне одной живой клетки. Существенных изменений в количестве цАМФ после введения ПБП-1 (0.01, 0.1, 1 and 10 мкМ) в культуру кардиомиоцитов и клеток гипофиза мышей не наблюдалось. Полученные данные ставят под сомнение физиологическую роль аденилатциклазной системы в качестве медиатора действия ПБП-1.

С использованием флуоресцентного  $Ca^{2+}$ -зонда Fura-2 AM впервые показано, что высокая концентрация ПБП-1 (10 мкМ) вызывает постепенное увеличение  $Ca^{2+}$ -ответа в клетках гипофиза. В культуре кардиомиоцитов мышей пептид в низкой концентрации (1 мкМ) повышает количество кальция и сохраняет на этом уровне.

*Метод FRET - ПБП-1 - кардиомиоциты - клетки гипофиза -  
флуоресцентный  $Ca^{2+}$ -зонд Fura-2 AM*

We used real-time FRET imaging (ForsterResonanceEnergyTransfer) to identify functionally relevant biochemical mechanisms of interconnection between signalling molecules of the brain (PRP-1) and second-messenger system cascades (cAMP,  $Ca^{2+}$ ). Using the FRET-based cAMP sensor Ipac1-camps, changes in [cAMP] can be monitored in real time in a single living cell. Our findings indicate that addition of hypothalamic neuropeptide PRP-1 (0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu$ M) to the culture of living murine cardiomyocytes and pituitary cells did not lead to cAMP response to ligand administration. Here we suggest, that adenylyl cyclase signaling pathway do not play significant role in PRP-1 signaling specificity.

Changes in cytoplasmic calcium concentration were monitored in cells loaded with the fluorescent  $Ca^{2+}$ -sensitive dye Fluo-2 AM. The present report describes, that murine cardiomyocytes are able to mobilize intracellular calcium after PRP-1 administration (1  $\mu$ M). In murine pituitary cells high-dose PRP-1 (10  $\mu$ M) administration gradually increased calcium level.

*FRET imaging - cardiomyocytes - pituitary cells - fluorescent  $Ca^{2+}$ -sensitive dye Fluo-2 AM*

Ֆորստեր ռեզոնանսային էներգիայի փոխանցման մեթոդի (FRET imaging) միջոցով ուսումնասիրել ենք հիպոթալամուսի ազդանշանային մոլեկուլների (մասնավորապես PRP-1) և սրտում ու հիպոֆիզում ներքջային երկրորդային միջնորդների (gGՄՖ և  $Ca^{2+}$ ) համակարգի միջև փոխկապակցման կենսաքիմիական մեխանիզմները: Գենետիկորեն կոդավորվող Epac1-camp FRET-սենսոր կրող կենդանի բջիջներում հետևել ենք gGՄՖ քանակության փոփոխության դինամիկա: Ըստ ստացված տվյալների՝ PRP-1 (0.01, 0.1, 1 և 10մկՄ) կոնցենտրացիաների ազդեցությամբ մկան կարդիոմիոցիտներում և հիպոֆիզի բջիջներում չեն գրանցվում gGՄՖ քանակության փոփոխություններ: Փորձարարական տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ ադենիլատ ցիկլազային համակարգը, ըստ երևույթին, PRP-1 ազդակի փոխանցման մեխանիզմում դեր չի կատարում:

Ֆլուորեսցենտային ինդիկատոր FURA-2 AM միջոցով ցույց է տրվել, որ մկան կարդիոմիոցիտներում PRP-1-ի (1մկՄ) ազդեցությամբ նկատվում է  $Ca^{2+}$  քանակության աճ, վիճակը կանոնավորվում է իսկույններ Նորմալից քիչ բարձր մակարդակի վրա: Մկան հիպոֆիզի բջիջներում PRP-1-ի բարձր կոնցենտրացիայի (10մկՄ) ազդեցությամբ գրանցվում է  $Ca^{2+}$  քանակության աստիճանական աճ:

*Ֆորստեր ռեզոնանսային էներգիայի փոխանցման մեթոդ (FRET imaging) - կարդիոմիոցիտներ - հիպոֆիզի բջիջներ - ֆլուորեսցենտային ինդիկատոր FURA-2 AM*

Скорость синтеза гликогена определяется активностью гликоген синтазы (ГС), расщепление катализируется гликоген фосфорилазой (ГФ) [12]. Оба фермента действуют на поверхности нерастворимых частиц гликогена, где они в зависимости от состояния обмена веществ могут находиться в активной или неактивной форме. Гликоген служит в организме резервом углеводов, из которых в тканях быстро создается глюкозо-1-фосфат. Нарушение регуляции распада либо синтеза гликогена путем внесения изменений в аллостерической регуляции или ковалентной модификации гликогенфосфорилазы (ГФ) и гликогенсинтазы (ГС) приводит к нарушению гомеостаза глюкозы крови [7, 14-15]. Ферментная система обмена гликогена находится под гормональным, нейрональным и метаболическим контролем. Гормональная регуляция гликогенфосфорилазы осуществляется не прямо, а через каскадные системы усиления сигналов, включающих соответствующие протеинкиназы (ПК) и фосфатазы. Сигнал передается внутрь клетки посредством каскадных механизмов, включающих серию внутриклеточных посредников (вторичные, третичные мессенджеры и т.д.). Циклические нуклеотиды – цАМФ, цГМФ и ионы кальция относятся ко вторичным мессенджерам, а цАМФ является также активатором протеинкиназ (ПК). Аденилатциклаза является генератором вторичного внутриклеточного посредника цАМФ. Образовавшийся цАМФ, располагаясь в контрольной точке (check point) различных сигнальных систем, способен через активацию цАМФ–зависимой протеинкиназы передавать гормональный сигнал к различным эффекторным системам вплоть до ГФ. Ионы кальция выполняют важнейшую регуляторную роль в клетках: они контролируют активность ферментов, стабилизируют клеточные структуры, а также способствуют передаче сигнала. Каскадный механизм индуцирует конформационные изменения в эффекторных молекулах и таким образом модулирует их функциональную активность. В работах некоторых авторов есть данные, свидетельствующие о роли циклических нуклеотидов и  $Ca^{2+}$  в реализации действия гипоталамических нейрогормонов на метаболизм и функции органов крыс [5-6]. Гипоталамический пролином богатый пептид-1 (ПБП-1), полученный в лаборатории акад. А.Галояна, обладает широким спектром биологической активности. Спектр воздействий ПБП-1 на иммунную и нервную системы

сопровождается заметной стимуляцией углеводного, белкового и липидного обменов [4, 9-11]. Как было установлено в наших экспериментах, пептид является регулятором для гликоген фосфорилазы [1-2]. Выявление места и особенностей пострецепторного действия нейросекреторного цитокина мозга в каскаде регуляции фосфорилазы – наиболее важного фермента деградации гликогена – представляет интерес в плане возможности найти альтернативный путь регуляции исследуемого нами фермента. Полученный ранее нами экспериментальный материал позволил выдвинуть предположение о том, что ПБП-1 оказывает глюкозерегулирующее действие в печеночной ткани, по-видимому, без участия аденилатциклазы и что, по всей вероятности, в этой сложной системе регуляции обмена гликогена существуют другие механизмы воздействия нейропептида на составляющие этого каскада. Данная работа является продолжением предыдущей [1] и ставит задачу – определить биологические механизмы взаимосвязи между сигнальными пептидами головного мозга, в частности ПБП-1, и системой вторичных посредников (цАМФ и  $\text{Ca}^{2+}$ ). Для решения поставленной задачи мы изучали влияние ПБП-1 на уровень вторичных посредников в кардиомиоцитах (СМ) желудочков сердца мышей, а также в клетках гипофиза. Такой подход основан на том, что цАМФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые пути передачи сигнала являются общепринятой мишенью в комбинированном фармакологическом лечении сердечной недостаточности (ивабрадин,  $\beta$ -блокаторы).

#### Материал и методика.

Для количественного определения циклических нуклеотидов с помощью метода FRET нами были использованы живые клетки, изолированные из трансгенных мышей, экспрессирующих сенсоры на цАМФ и цГМФ. Для измерения внутриклеточных уровней цАМФ в реальном времени использовали метод резонансного переноса энергии флуоресценции (Fluorescent resonance energy transfer, FRET). Используя FRET-индикатор Erap1-camps, разработанный специально для цАМФ [16], количественные изменения цАМФ можно отслеживать в реальном времени на уровне одной живой клетки. Erap1-camps состоит из цАМФ-связывающего домена (Erap1) (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. Под действием монохроматического света в области  $436 \pm 10$  нм (светоделитель DCLP, 460 нм) регистрировали флуоресценцию на уровне одной клетки по каналам YFP ( $535 \pm 15$ ) и CFP ( $485 \pm 20$  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.

С целью определения концентрации свободного цитозольного кальция мы использовали флуоресцентный  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный краситель Фура-2 АМ (Molecular Probes, Invitrogen).

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  $\text{Ca}^{2+}$  пропорциональна отношению флуоресценции при 340/380 [17].

#### Результаты и обсуждение.

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 и  $\text{Ca}^{2+}$ ).

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. 1). В то же время стимуляция кардиомиоцитов  $\beta$ -адренергическим агонистом – изопроterenолом привело к снижению соотношения YFP/CFP, указывая на повышении уровня цАМФ. Ранее наши исследования свидетельствовали о влиянии ПБП-1 на фосфорилирование основных членов семейства MAPK [8] и других регуляторов передачи сигналов. Интересно, что два цАМФ-эффектора: протеинкиназа А (ПКА) и Ерас могут косвенно активировать каскад MAPK. В наших исследованиях, по-видимому, Ерас-опосредованный путь передачи сигналов в кардиомиоцитах не играет существенной роли в трансдукции сигналов ПБП-1. Наши данные в некотором роде оставляют сомнение о 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.

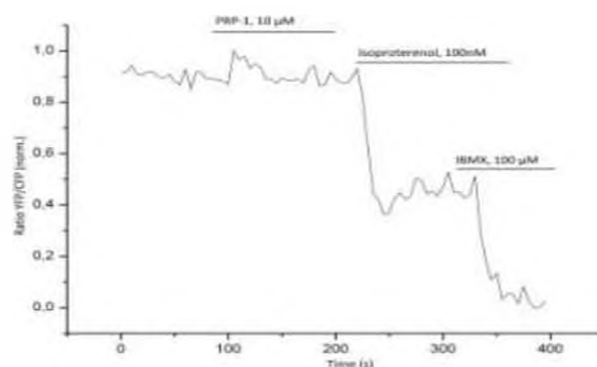


Рис. 1. Кривая изменений внутриклеточной концентрации цАМФ в первичных кардиомиоцитах трансгенных мышей, экспрессирующих Ерас1-samps сенсоры, индуцированных 10 мкмоль ПБП-1. Представлены данные 5 экспериментов.

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.

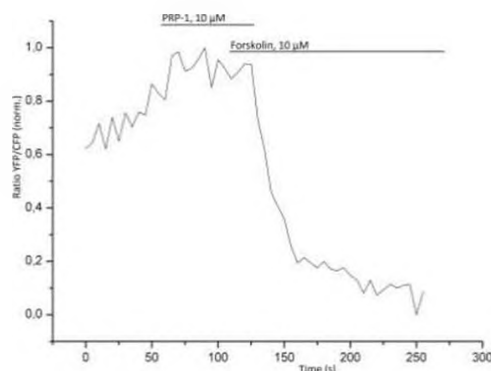


Рис. 2. Кривая изменений внутриклеточной концентрации цАМФ в клетках гипофиза мышей индуцированных 10 мкмоль ПБП-1. FRET представлен как отношение флуоресценций акцептора и донора (535/485).

#### ПБП-1 индуцированное изменение внутриклеточного кальция.

Согласно существующим данным, амплитуда, частота, источник и внутриклеточная локализация сигналов от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  являются идентификаторами определенных транскрипционных ответов клетки [13]. Это позволяет управлять широким спектром клеточных процессов в ответ на  $\text{Ca}^{2+}$ .

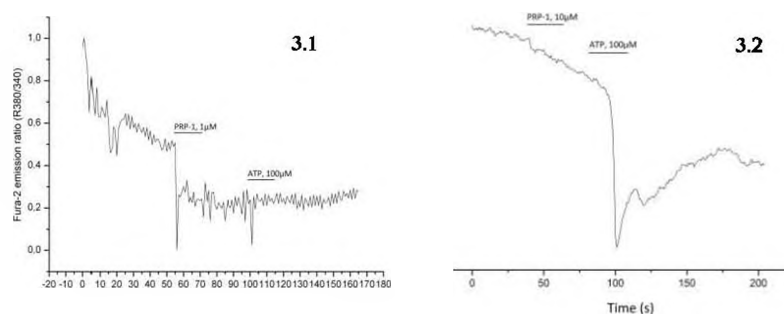


Рис. 3. Динамика изменений внутриклеточного кальция в свежelyделенных кардиомиоцитах и клетках гипофиза мышей (в условиях *in vivo*) в ответ на действие ПБП-1. Внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в первичных культурах клеток измерялась при помощи флуоресцентного зонда Fura 2-AM.

Динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, запускающих сокращения кардиомиоцитов, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии в культуре, менялась под воздействием пролином богатого полипептида. Аппликация пептида в низкой концентрации (1 мкмоль) в культуре кардиомиоцитов вызывала мгновенное снижение амплитуды и через 5 сек стабилизировалась на низком уровне (рис. 3.1). Высокая концентрация ПБП-1 (10 мкмоль) ведет к постепенному снижению амплитуды  $\text{Ca}$ -сигналов в клетках

гипофиза (рис. 3.2). 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 селекции в клетке, в настоящее время остается невыясненным.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ераносян Л.А. Молекулярные механизмы сопряжения нейрогомона PRP-1 с аденилатциклазной сигнальной системой. *Кровь*, 1(15), С.84-89, 2013.
2. Тер-Татевосян Л.П., Аракелян Л.Н., Ераносян Л.А., Чалян С.Г., А.А. Галоян Поиск нейрогуморальных путей регуляции активности гликогенфосфорилазы тканей крыс при участии PRP-1. *Медицинская наука Армении*, 50(2), С.54-60, 2013.
3. Тер-Татевосян Л.П., Саркисян Л.В., Ераносян Л.А., Аракелян Л.Н., Ширинян Э.А., Галоян А.А. Ферменты углеводно-фосфорного обмена в костном мозге и селезенке при десимпатизации. Эффекты нейропептида PRP-1. *Нейрохимия*, 26(4), С.333-336, 2009.
4. Akopian A., Galoyan A. Effect of hypothalamic proline-rich polypeptide on voltage-gated  $Ca^{2+}$  currents in retinal ganglion cells. *NeurochemRes.* 28(12) : 1867-1871, 2003.
5. Borgeat P., Chavancy G., Dupont A., Labric F., Arimura A., Schally A.V. Stimulation of 3', 5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone releasing hormone; *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 69, 2677-2681, 1972.
6. Bourne G.A., Baldwin D.M. Evidence for cAMP as a mediator of gonadotropin secretion from female pituitaries; *Ant. J. Physiol.* 253, E290-E295, 1987.
7. Browner M.F., Fletterick R.J. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biol. Sci.*, 17: 66-71, 1992.
8. Galoian K., Temple H.T., Galoyan A.A. mTORC1 inhibition and ECM-cell adhesion-independent drug resistance via PI3K-AKT and PI3K-RAS-MAPK feedback loops. *Tumour Biol. Jun*; 33(3):885-90 22246604, 2012.
9. Galoyan A.A. Brain neurosecretory cytokines. Immune response and neuronal survival. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 188 pp. 2004.
10. Galoyan A.A. Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: Signal molecules. *Neurochem Res.*, 25(9/10): 1343-1355. 2000.
11. Galoyan A.A., Aprikian V.S., Markosian K.A., Gurvits B.Y. Neurosecretion of cytokines by magnocellular cells of hypothalamus. *Neirokhimiya (RAS and NAS RA)*, 15(2): 360-372. 1998.
12. Hudson J.W., Golding G.B., Crerar M.M. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol.*, 234: 700-721. 1993.
13. Ikura M., Osawa M., Ames J.B. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays. Jul*; 24(7): 625-36. 2002.
14. Johnson N.L. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FAS EB J.*, 6: 2274-2282). 1992.
15. Newgard C.B., Hwang P.K., Fletterick R.J. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Grit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24, 66-99. 1989.
16. Nikolaev V.O., Bunemann M., Hein L., Hamawacker A., Lohse M.J. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.*; 279: 37215-37218, 2004.
17. Xu Y.J., Shao Q., Dhalla N.S. Fura-2 fluorescent technique for the assessment of  $Ca^{2+}$  homeostasis in cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.*, Jul; 172(1-2): 149-57. 1997.



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

## ИНГИБИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА АМИЛИНА ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ КОМПОНЕНТАМИ

С. Г. ШАРОЯН, А. А. АНТОНЯН, С. С. МАРЦАНЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА  
biochem@ipia.sci.am

Фибриллизация пептидного гормона поджелудочной железы, амилина, считается одной из причин гибели  $\beta$ -клеток при сахарном диабете 2-го типа. Исследовали влияние препаратов из шести видов растений на агрегацию амилина. Степень агрегированности оценивали по интенсивности флуоресценции и флуоресцентно-микроскопическим снимкам тиофлавин-содержавших препаратов. Этаноловые экстракты пяти растений, кроме экстракта из корня перестушия белого, ингибировали агрегацию амилина. Наиболее эффективными ( $> 90\%$ ) оказались экстракты конского щавеля и виноградных листьев. Эффективны были также кумариновые фракции из конского щавеля и донника лекарственного. Экстракты донника лекарственного, листьев винограда и конского щавеля приводили к дезагрегации предварительно образованных агрегатов амилина соответственно на 70, 90 и 100 %. На основании полученных данных можно рекомендовать: а) частое использование указанных растений лицами, находящимися в группе риска; б) проведение клинических исследований с целью использования данных растений и их экстрактов в качестве антидиабетических средств.

*Амилин - амилоидоз - растительные экстракты - растительные кумарины*

Fibrillation of peptide hormone of pancreas, amylin, is considered as one of causes of death of  $\beta$ -cells in type 2 diabetes. The effect of six species medical plants on aggregation of amylin was investigated. Aggregation degree was evaluated by fluorescence intensity and fluorescence microscope images of thioflavin-containing incubation mixture. Ethanol extracts of five plants inhibited the aggregation of amylin. The extracts of sorrel and grape leaves were most effective, by  $> 90\%$ . The coumarin fractions of sorrel and melilot were also effective. Extracts of melilot, grape and sorrel leaves led to disaggregation of preformed aggregates of amylin, respectively, by 70, 90 and 100 %. Based on these data we can recommend: a) frequent usage of these plants by persons at risk group; b) conducting clinical studies of these plants and their extracts as antidiabetic agents.

*Amylin - amyloidosis - plant extracts - plant coumarins*



Ենթաստամոքսային գեղձի պեպտիդային հորմոնի, ամիլինի, ֆիբրիլացումը համարվում է  $\beta$ -քշիջների մահվան և 2-րդ տեսակի շաքարախտի պատճառներից մեկը: Ուսումնասիրվել է պեպտիդի ամիլոիդային վիճակի վրա վեց տեսակի դեղաբույսերի ազդեցությունը: Ամիլոիդային վիճակը գնահատվել է տիոֆլավինի հետ ուսումնասիրվող լուծույթի խառնուրդի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությամբ և ֆլուորեսցենտ մանրադիտակով ստացված պատկերներով: Հինգ բույսերի էթանոլային թուրմերը արգելակում էին ամիլինի ագրեգացումը: Առավել արդյունավետ էին՝  $> 90 \%$ , ավելուկի և խաղողի տերևների թուրմերը: Նաև արդյունավետ էին ավելուկի և իշառվույտի կուժարինային ֆրակցիաները: Իշառվույտի, խաղողի և ավելուկի տերևների թուրմերը համապատասխանաբար 70, 90 և 100 %-ով քայքայում էին ամիլինի նախորդը կազմված ագրեգատները: Այս տվյալների հիման վրա կարող ենք առաջարկել ա) այդ բույսերի համախառն օգտագործումը վտանգի տակ գտնվող անձանց կողմից; բ) իրականացնել այդ բույսերի և դրանց բաղադրիչների կլինիկական ուսումնասիրություններ որպես հակադիաբետիկ գործոններ:

*Ամիլին - ամիլոիդոզ - բուսական թուրմեր - բուսական կուժարիններ*

Амилоидные фибриллы, являющиеся причиной различных патологий, сходны по своей морфологии и структуре, независимо от аминокислотного состава и последовательности образующих белков [8, 23]. Неправильное сворачивание пептидов и белков приводит к формированию строго упорядоченных амилоидных агрегатов [4-5]. Термодинамически амилоидное состояние пептида более стабильно, а нативная форма белка является метастабильным состоянием [2]. Неправильное сворачивание белка, его самосборка в нерастворимые амилоидные фибриллярные структуры и формирование строго упорядоченных накоплений лежат в основе многих тяжелых заболеваний, составляющих группу амилоидзависимых патологий (в скобках указаны соответствующие амилоидные белки): болезнь Альцгеймера (амилоидные  $\beta$ -пептиды, тау-белок), болезнь Паркинсона ( $\alpha$ -синуклеин), диабет 2 типа (амилин), диализный амилоидоз ( $\beta$ 2-микроглобулин), катаракта (кристаллин), лизоцим-системный амилоидоз (лизоцим), и т.д. [10, 18, 20].

В настоящее время нет терапевтических средств, успешно противостоящих формированию фибриллярных агрегатов. Учитывая высокую стоимость и побочные эффекты синтетических лекарств, а также неполное выздоровление пациентов при их использовании, проводятся исследования по разработке подходов, основанных на использовании природных препаратов из растений. Природные соединения с широким спектром биологической активности представляют собой один из основных источников для разработки новых терапевтических препаратов [6]. Небольшие молекулы из растений способны понижать риск таких заболеваний, как рак, диабет, сердечно-сосудистые и невропатологические заболевания [3, 9, 11, 14]. Полифенолы ингибируют образование фибриллярных агрегатов амилоидных белков и понижают их цитотоксичность. При этом важны особенности их структуры и специфические ароматические взаимодействия, которые следует учитывать при разработке новых терапевтических средств для лечения обусловленных амилоидозом заболеваний [19].

Амилоидный полипептид амилин содержит 37 аминокислотных остатков и является одним из основных секреторных продуктов  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [21, 7]. Это регуляторный пептид, функционирующий как в островках  $\beta$ -клеток (где он ингибирует секрецию инсулина и глюкагона), так и в некоторых других органах. Амилоидные отложения амилина были обнаружены в островках  $\beta$ -клеток при сахарном диабете 2 типа у людей и у некоторых млекопитающих (обезьяны и кошки). Агрегированный амилин цитотоксичен и, как полагают,

играет важную роль в потере  $\beta$ -клеток при диабете 2 типа и при их пересадке людям с диабетом 1 типа [22].

Известно ингибирование образования амилоидной структуры амилина такими природными соединениями, как флавоноиды (мирицетин, кверцетин, кемпферол и пр.), полифенолы (галлат эпигаллокатехина, розмариновая кислота, куркумин и пр.) и т.д. [1,15,16]. Очевидно, что цитотоксичность пептида в отношении  $\beta$ -клеток может быть уменьшена этими соединениями. Действительно, галлат эпигаллокатехина из зеленого чая *in vitro* ингибировал амилоидогенез амилина и дестабилизировал его предварительно сформированные агрегаты [17].

Растительные соединения, проявляющие антиамилоидогенную активность в отношении амилина, могут быть предложены для разработки препаратов против диабета. Настоящая работа направлена на проверку такой активности у растений, используемых в пищу или в народной медицине (корень переступня белого, виноградные листья, конский щавель, семена расторопши, донник лекарственный, листья ежевики). Изучена также активность кумариновых фракций из конского щавеля и донника лекарственного.

#### Материал и методика.

Сефадексы G-25 и LH-20 были приобретены у фирмы "Pharmacia Biotech" (Упсала, Швеция), амилин – у фирмы "Gene Cust" (Люксембург), Тиофлавин (ThT) – у фирмы "Sigma" (США). Остальные реактивы и растворители были высокой степени чистоты. Измерения проведены на спектрофотометре "Specord M-40" фирмы Specord (Германия); спектрофлуорометре MPF-44A фирмы "Perkin-Elmer", (США); флуоресцентном микроскопе модели BH2 RFCA, фирмы Olympus.

Корень переступня белого (*Bryonia alba*) и семена расторопши (*Cardulus silybum*) приобретены из Фитотерапевтического центра "Артемисия" (Армения). Донник лекарственный (*Melilotus officinalis*), виноградные листья (*Vitis vinifera*), конский щавель (*Rumex crispus*), листья ежевики (*Rubus caesius*) собраны в Араратской долине. Растительный материал был идентифицирован сотрудником кафедры ботаники биологического факультета ЕГУ кандидатом биологических наук Нарине Закарян.

Высушенные в тени растения измельчали в ступке и суспензировали в 70 %-ном этаноле в соотношении 1:10 (вес/объем). Суспензию выдерживали 3 сут в закрытой темной посуде при комнатной температуре, фильтровали через стерильную марлю и стеклянный фильтр. Полученный экстракт высушивали до постоянного веса и хранили до использования при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Для получения компонентов экстрактов, навеску высушенного экстракта растворяли в 70 %-ном этаноле и подвергали последовательной гель-фильтрации на колонках с сефадексами LH-20 и G-25, уравновешанных 20 %-ным этанолом. Фракции элюировали возрастающими концентрациями этанола до 70 %. Кумариновые фракции с колонки G-25 элюировали 20 %-ным этанолом. Их наличие определяли по красно-вишневому окрашиванию реактивом Паули после кипячения в щелочной среде. Чистоту препарата оценивали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Кумариновые фракции высушивали и хранили при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ , как описано выше. В опытах, в качестве исходного, использовали 1 или 2 %-ные (вес/объем) растворы (в 70 %-ном этаноле) высушенных растительных препаратов.

Для приготовления исходного раствора амилина к 1 мг пептида добавляли 0,8 мл свежеекипяченной и охлажденной бидистиллированной воды, размешивали и через 30 мин центрифугировали. Спектр поглощения надосадочного раствора регистрировали в пределах 220-320 нм. Молярную концентрацию пептида оценивали, используя молярный коэффициент экстинкции ( $\epsilon$ ) тирозина при 276 нм,  $1,39 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

Агрегаты амилина получали, инкубируя пептид, в концентрации 50-70 мкМ, при  $37^{\circ}\text{C}$  в 20-40 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, в присутствии 0,02 %-ного азида Na в течение 3-8 сут. При исследовании влияния растительных препаратов на процесс агрегации выявлено, что

аналогичная инкубационная среда содержала также раствор растительного препарата. В опытах с амилином концентрация растительных препаратов была в пределах 0,3-0,8 %.

В опытах по дезагрегации фибрилл амилина суспензию фибрилл, образовавшихся в процессе предварительного инкубирования раствора пептида без добавок в течение 8 сут. при описанных выше условиях инкубировали при 37°C в течение 2-х сут в присутствии исследуемых растительных экстрактов.

Тиофлавин (ThT) в присутствии белковых агрегатов флуоресцирует при длине волны 485 нм (длина волны возбуждения 430 нм), в то время как сам ThT, а также его комплексы с мономерами или димерами пептидов не имеют этого спектра [12-13]. Степень агрегированности пептидов оценивали по интенсивности спектра флуоресценции ThT в смеси, содержащей аликвоты инкубированных пептидов. Смесь в 290 мкл фосфатного буфера, pH 7.4, содержала 8 мкМ пептида и 8,6 мкМ ThT. Об агрегированности судили также по снимкам образцов, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа.

### Результаты и обсуждение.

Чтобы оценить способность растительных препаратов предотвращать образование агрегатов амилина, идентичные растворы пептида инкубировали в отсутствие и в присутствии исследуемых препаратов. Аликвоты из этих проб вносили в буферную смесь с ThT и регистрировали спектр флуоресценции в пределах 460-520 нм, при длине волны возбуждения 430 нм.

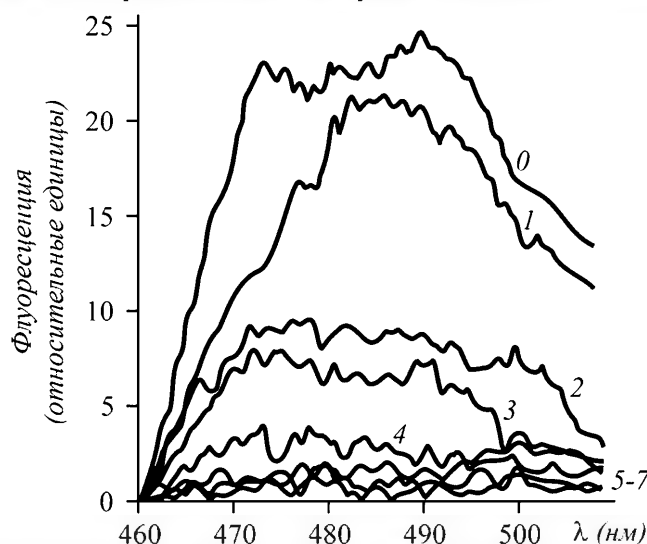


Рис. 1. Спектры флуоресценции ( $\lambda$  возб. 430 нм) ThT в смесях, содержащих аликвоты пептидов, инкубированных в течение 96 ч. 0 – контроль, амилин инкубирован в отсутствие растительных препаратов; 1 – инкубационная смесь содержала экстракт из корня переступня белого; 2 и 3 – экстракт из семян расторопши и кумариновую фракцию донника лекарственного; 4 – экстракт донника; 5-7 – экстракты конского щавеля, листьев ежевики и кумарина, очищенного из экстракта конского щавеля.

На рис. 1 приведены типичные спектры флуоресценции комплексов ThT с амилином, инкубированным в течение 96 ч в отсутствие (кривая 0) и в присутствии экстрактов пяти видов растений и двух кумариновых фракций. Из рис. видно, что экстракты конского щавеля и листьев ежевики, а также кумарин конского щавеля почти полностью предотвращал образование агрегатов амилина. Так же хорошо, на 85 %, ингибировали экстракт донника лекарственного. Экстракт из корня переступня белого почти не влиял на процесс агрегации амилина.

На рис. 2 представлены изображения, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа проб, обработанных аналогично пробам, спектры которых приведены на рис. 1. На рис. полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, можно видеть крупные образования на снимке амилина без каких-либо добавок. В тех случаях, когда раствор пептида в процессе инкубирования содержал экстракт листьев ежевики или конского щавеля, а также экстракт семян расторопши, эти образования почти полностью отсутствуют. В случаях, когда раствор пептида инкубировали в присутствии кумаринов конского щавеля и донника лекарственного, наблюдаемые на первом снимке образования значительно измельчены и разрыхлены.

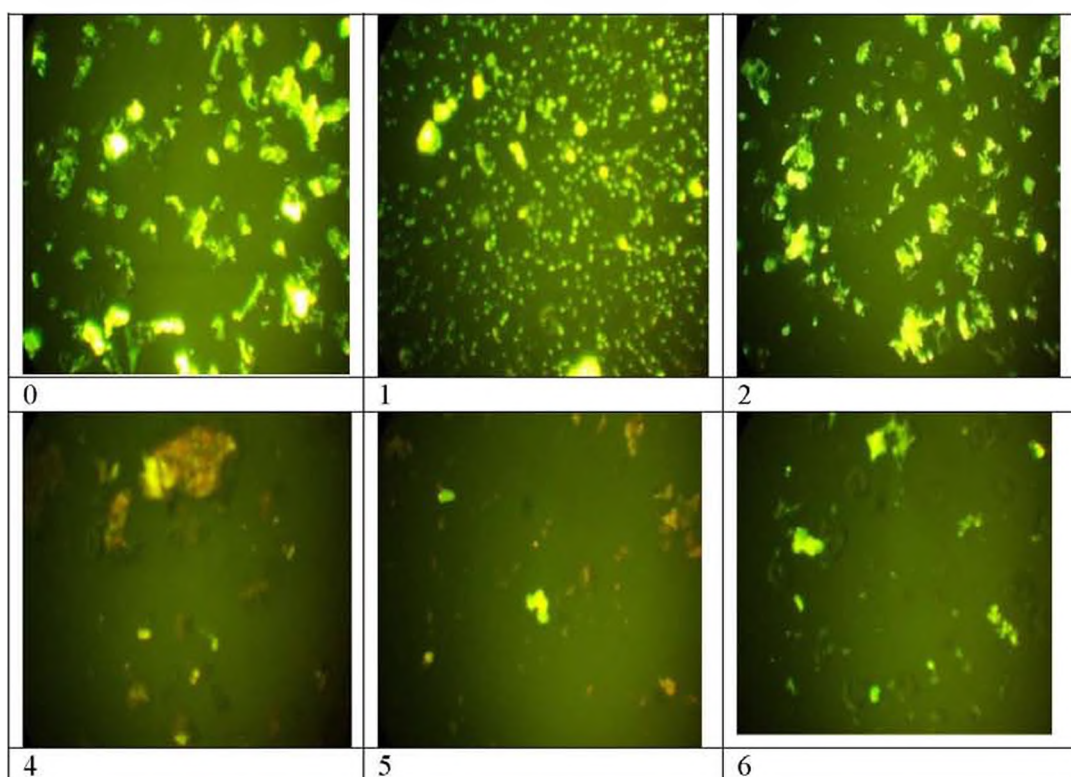


Рис. 2. 0 – амилин, инкубированный в течение 96 час при 37°C без добавок и в присутствии: 1 и 2 – кумаринов из конского щавеля и донника лекарственного, 4, 5 и 6 – экстрактов листьев ежевики, конского щавеля и семян расторопши.

Результаты исследования, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют о том, что использованные нами растительные препараты препятствуют образованию агрегатов амилина.

Было проведено три независимых опыта по влиянию на процесс агрегации амилина экстрактов 6-ти видов растений. Степень агрегированности амилина в исследуемых смесях была оценена по интенсивности флуоресценции ThT в комплексе с пептидным препаратом как процент от флуоресценции образца без добавок (контроль). На рис. 3 показаны данные, полученные в трех независимых опытах, усредненные для каждого растения.

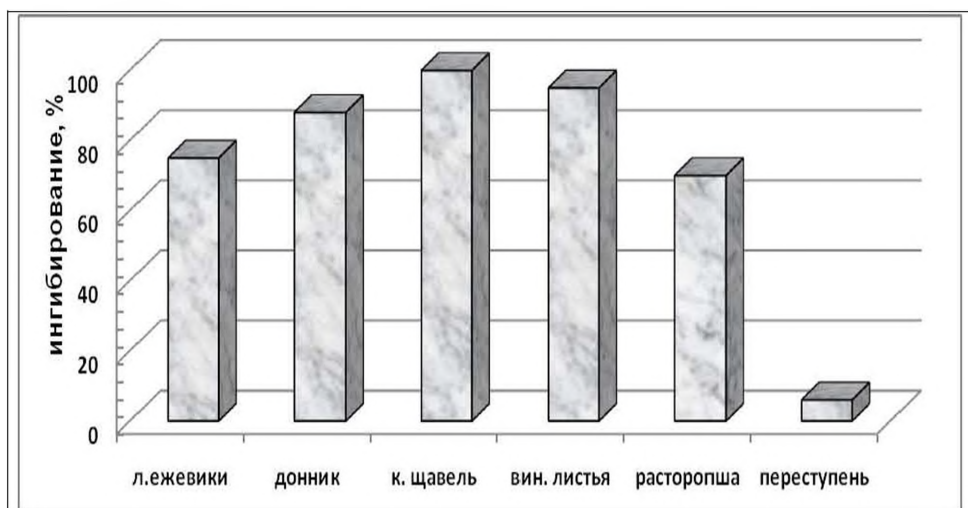


Рис. 3. Усредненные показатели ингибирования агрегации амилина экстрактами растений.

Чтобы оценить способность исследуемых растительных препаратов дезагрегировать предварительно образованные агрегаты амилина, был проделан следующий опыт. Раствор амилина в концентрации 60 мкМ без добавок инкубировали в течение 8 сут при 37°C и регистрировали спектр флуоресценции, свидетельствующий об образовании агрегатов. Из этого раствора отбирали алиquotы по 60 мкл и добавляли растительные экстракты до 0,5 %. Алиquotы с растительными препаратами (контроль, без добавок) инкубировали двое суток при тех же условиях. На рис. 4 кривая 0 представляет спектр флуоресценции амилина без добавок, инкубированного в течение 10 сут. Кривые 1, 2 и 3 – спектры флуоресценции алиquot агрегированного амилина, инкубированных в течение двух суток в присутствии экстрактов листьев, соответственно донника, винограда и конского щавеля. Как свидетельствуют кривые, экстракты привели к дезагрегации агрегатов амилина на 70, 90 и 100 %, соответственно.

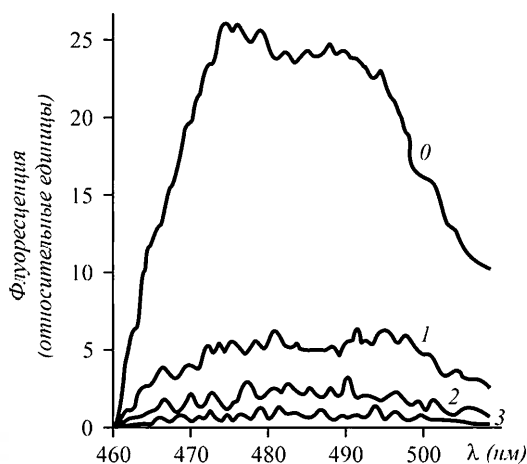


Рис. 4. Спектр флуоресценции агрегированного в течение 10-ти сут препарата амилина (кривая 0) и аналогичных образцов, инкубированных в течение 2-х сут в присутствии экстрактов листьев донника лекарственного (1), винограда (2) и конского щавеля (3).

На рис. 5 представлены снимки, полученные на флуоресцентном микроскопе для проб, обработанных аналогичным образом. Здесь также как и в опытах с фибриллизацией (рис. 2), видны крупные флуоресцирующие образования в суспензии амилина без добавок, которые в образцах, инкубированных в присутствии растительных препаратов, существенно раздроблены и даже полностью отсутствуют.

Следовательно, как спектры флуоресценции (рис. 4), так и флуоресцентные снимки (рис. 5) позволяют сделать вывод о том, что исследованные нами растительные препараты способны дезагрегировать предварительно образованные фибриллы амилина.

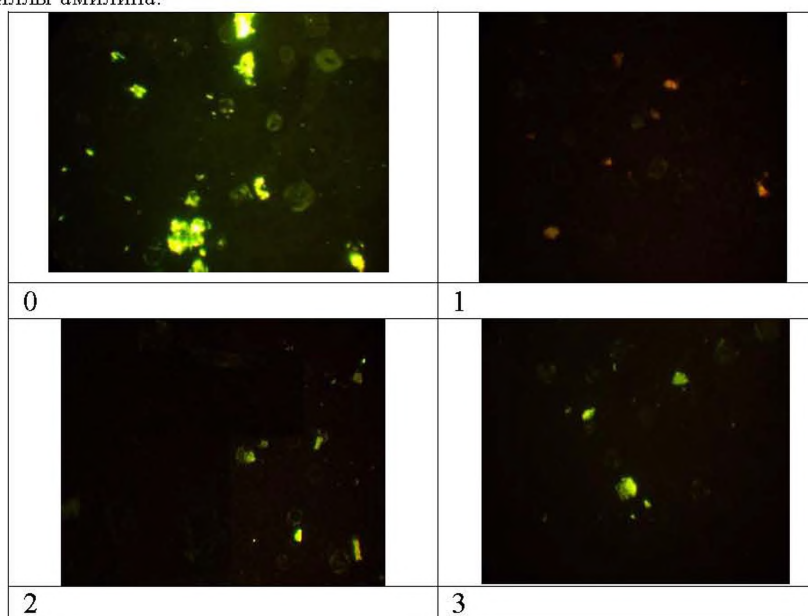


Рис. 5. 0 – предварительно агрегированный амилин, 1, 2, 3 – его алиquotы, инкубированные в присутствии экстрактов листьев конского щавеля и винограда и семян расторопши.

Таким образом, в настоящей работе исследовано влияние этаноловых экстрактов 6-ти видов растений и двух выделенных из них кумариновых фракций на процесс агрегации пептидного гормона поджелудочной железы, амилина.

Пептиды инкубировали в определенных условиях в присутствии растительных экстрактов и, в качестве контроля, в их отсутствие. Степень агрегированности пептидов оценивали по интенсивности спектров флуоресценции смеси алиquot инкубированных препаратов с тиюфлавином, а также по снимкам этих же смесей, полученным с помощью флуоресцентного микроскопа. Проведенные эксперименты впервые показали, что 5 из 6-ти экстрактов исследованных растений способны ингибировать процесс агрегации амилина. Притом, наиболее эффективно, на 90 % и более, действуют экстракты листьев конского щавеля и винограда. Экстракт корня переступня белого практически не влиял на процесс агрегации. Существенно препятствовали агрегации пептида кумариновые фракции, выделенные из экстрактов конского щавеля и донника лекарственного. Исследование влияния некоторых растительных экстрактов на процесс дезагрегации предварительно образованных агрегатов амилина показали, что экстракты донника лекарственного, листьев винограда и конского щавеля способны дезагрегировать фибриллы амилина на 70, 90 и 100 %.



Следует отметить, что отобранные нами растения издавна применяют в Армении в качестве пищи или как лечебное средство. Поэтому на основании полученных данных можно рекомендовать: а) частое их использование лицам, находящимися в группе риска; б) проведение клинических исследований с целью использования данных растений и их экстрактов в качестве антидиабетических средств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Aarabi M.-H., Mirhashemi S.M.*, The role of two natural flavonoids on human amylin aggregation, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 2374-2379, 2012.
2. *Baldwin, A.J., Knowles, T.P.J., Tartaglia, G.G., Fitzpatrick, A.W., Devlin, G.L., Shammas, S.L., Waudby, C.A., Mossuto, M.F., Meehan, S., Gras, S., et al.*, Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14160-3, 2011.
3. *Carocho, M., Ferreira I.C.F.R.*, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25, 2013.
4. *Chiti, F., Dobson, C.M.* Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 333-366, 2006.
5. *Chiti, F., Dobson, C.M.* Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.*, 5, 15-22, 2009.
6. *Clardy, J., Walsh C.*, Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837, 2004.
7. *Cooper G.J.S., Leighton B., Dimitriadis GD, Parry-Billings M., Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC, Reid KBM.* Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 7763-7767, 1988.
8. *Greenwald, J., Riek, R.* Biology of amyloid: Structure, function, and regulation. *Structure*, 18, 1244-1260, 2010.
9. *Hawkes, C.A.; Ng V., McLaurin, J.A.* Small molecule inhibitors of A $\beta$ -aggregation and neurotoxicity. *Drug Dev. Res.*, 70, 111-124, 2009.
10. *Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R., Ventura, S.* Protein aggregation: Mechanisms and functional consequences. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44, 1541-1554, 2012.
11. *Joyner, P.M., Cichewicz, R.H.* Bringing natural products into the fold - Exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding related neurodegenerative diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 26-47, 2011.
12. *Klajnert, B., Cladera, J., Bryszewska, M.*, Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence. *Biomacromolecules* 7, 2186-21915, 2006.
13. *LeVine H.*, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science.*, 2, 404-410, 1993.
14. *Mecocci P., Polidori, M.C.* Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 631-638, 2012.
15. *Meng F., Abedini A., Plesner A., Verchere C.B., Raleigh D.P.*, The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils and Protects Cultured Cells Against IAPP Induced Toxicity. *Biochemistry*, 49 (37): 8127-8133, 2010.
16. *Mirhashemi S.M., Aarabi M.-H.*, Effect of two herbal polyphenol compounds on human amylin amyloid formation and destabilization *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 3207-3212, 2012.
17. *Mirhashemi S.M., Aarabi M.-H.* To evaluate likely anti-amyloidogenic property of ferulic acid and baicalein against human islet amyloid polypeptide aggregation, in vitro Study. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (9), 671-676, 2012.
18. *Pastore A., Temussi P.* Protein aggregation and misfolding: Good or evil? *J. Phys. Condens. Matter*, 24, p. 1-9, 2012.

19. *Porat Y., Abramowitz A., Gazit E.*, Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism, *Chem Biol Drug Des*; 67, 27–37, 2006.
20. *Stefani M.*, Protein misfolding and aggregation: New examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim. Biophys. Acta*, 1739, p. 5–25, 2004.
21. *Westermarck P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D.W., O'Brien T.D., Johnson K.H. et al* Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl.Acad Sci USA* 84, 3881–3885, 1987.
22. *Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT.* Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus. *Physiol Rev*, 91, 795–826, 2011.
23. *Zerovnik, E.* Amyloid fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.* 269, 3362–3371, 2002.

#### **Благодарность**

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГКН МОН РА в рамках научного проекта № SCS # 13-1F186.