

УДК 577.15

**Роль гипоталамического ПБП-1
в механизме регуляции активности
щелочной и кислой фосфатаз у крыс
при коразол-индуцированной эпилепсии**

**Л.П. Тер-Татевосян, Л.Н. Аракелян, А.С. Маргарян,
Р.Б. Бадалян, А.А. Симонян, С.Г. Чаилян**

*Институт биохимии им. Г.Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: пролином богатый полипептид (ПБП), щелочная и кислая фосфатазы, коразол, эпилепсия

Роль гормонов, имеющих широкий диапазон терапевтического действия, ввиду их способности влиять на активность разных ферментативных систем и метаболизм клеток – неоспорима. После открытия гипоталамических нейрогормонов пептидной природы и установления разнонаправленности их биологической активности вызвало интерес выявление путей реализации его физиологических эффектов и взаимодействие с другими медиаторными системами. Регуляторные пептиды и сопряженные с их функцией ферменты сегодня рассматриваются как сложная адаптивная система организма, организующая приспособительные реакции на всех уровнях его интеграции. Нарушения в функционировании сети сигнал-трансдуцирующих ферментов клетки играют ключевую роль в развитии значительного числа болезней [8, 12].

Гипоталамический ПБП-1 (Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr), обладающий широким спектром биологической активности, является регулятором гуморального и клеточного иммунитета [5, 7, 9, 10]. Спектр воздействия пептида на иммунную и нервные системы сопровождается стимуляцией ферментов углеводно-фосфорного обмена [3, 15, 16]. Фосфорилирование является основным механизмом при рецепторзависимом ответе клеток на внешние и внутренние воздействия. В результате белок становится способным распознать, связать, активировать, деактивировать или дефосфорилировать субстрат. Взаимопереход между активной и неактивной формами белка (фосфорилирование-дефосфорилирование) является динамическим процессом, приводящим к определенному равновесному состоянию.

Фосфатазы – ферменты, осуществляющие дефосфорилирование модифицированного белка, широко распространены в органическом мире. Их типичными представителями являются щелочная (ЩФ) и кислая фосфатазы (КФ). Подавление деятельности этих фосфомоноэстераз сопровождается определенными функциональными нарушениями [8, 12]. Обнаруженные существенные изменения в уровнях активности ЩФ и КФ при патологических процессах (Паркинсон, нарушения ЦНС, онкологические заболевания и ряд других) говорят о значимости этих ферментов в регуляции различных механизмов обмена веществ и позволяют использовать их в качестве информативных маркеров в медицинских целях [6, 11].

Одно из психических заболеваний, возникающих при различных органических поражениях головного мозга, – эпилепсия. В патогенезе эпилепсии значительную роль играют нарушения взаимодействия нейромедиаторных систем; одновременно расстройство ионных сдвигов ведет к повышению мембранной проницаемости и деполяризации нейронов, ведущих к последующей сверхвозбудимости. Сдвиги в системах нейротрансдачи могут считаться начальным звеном патогенеза, и существующая ныне фармакотерапия во многом направлена на коррекцию нарушения связей между нейромедиаторными системами. В данной работе сделана попытка выяснить место и роль гипоталамического ПБП-1 в механизме регуляции ферментативной активности ЩФ и КФ у крыс при пентилентетразол-индуцированной эпилепсии.

Материал и методы

В эксперименте использованы белые крысы-самцы массой 180-200 г, содержащиеся в условиях вивария. Эпилептиформные припадки вызывали однократным введением коразола внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г живой массы [2]. Подопытные животные были разделены на 4 группы:

- контрольная группа – крысам вводили 1 мл физраствора 1 раз;
- I опытная группа – крысам 2 дня вводили однократно ПБП-1 из расчета 1γ в 1 мл физраствора;
- II опытная группа – крысам вводили однократно коразол из расчета 8 мг в 1 мл физраствора на 100 г живой массы;
- III опытная группа – крысам в течение 2 дней вводили однократно ПБП-1 из расчета 1γ в 1 мл физраствора, а в день проведения эксперимента вводили коразол из расчета 8 мг на 100 г живой массы, растворенный в 1 мл физраствора.

У крыс II группы экспериментальные припадки проявлялись уже через 12-14 мин после введения коразола, а у крыс III группы слабые проявления судорожного припадка наблюдались через 20-25 мин. Стадии судорог определялись по модифицированной шкале Racine R.J. [14].

Животных декапитировали после полного проявления генерализированных тоникоклонических судорог. Печень быстро извлекали, промывали в дистилляте, гомогенизировали. Цитоплазматическую фракцию центрифугировали 10 мин при 600g, митохондрии – 15 мин при 10000g.

Активность ЩФ (Щ.Ф.3.1.3.1) и КФ (К.Ф.3.1.3.2) в гомогенатах и фракциях определяли методом Шлыгина и Михлина [4]. В качестве субстрата использовали *p*-нитрофенилфосфат ("Serva") в концентрации 2×10^{-3} М в медиановом буфере, рН 9.6 – для ЩФ и рН 4.6 – для КФ. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 40% ТХУ. Активность ферментов определяли по количеству паранитрофенола, выделенного в течение 1 часа при 37°C (длина волны 410 нм). Для определения ферментативных активностей использовали спектрофотометрические методы. За единицу активности фермента (Е) принимали то его количество, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в минуту. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента [1]. Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что печень – важнейшая метаболическая ткань и основной орган детоксикации организма. Одним из характерных признаков патологических изменений в клетках печени является изменение уровня активности ферментов углеводно-фосфорного обмена, в частности ЩФ и КФ.

На начальном этапе нашего исследования оценивали прямое (*in vivo*) воздействие нейропептида ПБП-1 на активность печеночных фосфатаз в гомогенате здоровых (интактных) крыс (табл.). Данные эксперимента показали, что пептид не обладает способностью какого-либо значительного влияния на ЩФ; спад ферментативной активности по отношению к норме составляет всего 3%. Диаметрально противоположный эффект ПБП-1 оказывает на КФ – каталитическая активация этого фермента высокая и составляет 30%. Эти показания согласуются с данными наших предыдущих работ и говорят об их достоверности [3, 15, 16].

Таблица

Активность щелочной и кислой фосфатаз в печени крыс в Е активности (n=6)

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА				
Опытные группы	Интakтные крысы	ПБП-1	Коразол	Коразол + ПБП-1
Гомогенат	581.0 ± 5.0	569.0 ± 9.2 - 3%	806.0 ± 13.4 **p ₁ < 0.001 + 40%	736.0 ± 15.2 ***p ₂ < 0.005 - 9%
Цитоплазма	504.5 ± 26.6	484.0 ± 19.3 - 4%	792.0 ± 21.8 p ₁ < 0.001 + 57%	708.0 ± 28.2 p ₂ < 0.05 - 11%
Митохондрии	12.5 ± 0.81	15.0 ± 0.65 *p < 0.05 + 20%	18.5 ± 1.77 p ₁ < 0.025 + 48%	15.5 ± 1.6 - 6%
КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА				
Опытные группы	Интakтные крысы	ПБП-1	Коразол	Коразол + ПБП-1
Гомогенат	1050.0 ± 56.5	1365.0 ± 25.8 p < 0.005 + 30%	2002.0 ± 67.8 p ₁ < 0.001 + 90%	1255.0 ± 50.0 p ₂ < 0.001 - 37%
Цитоплазма	703.0 ± 25.5	798.0 ± 30.6 p < 0.05 + 14%	1308.0 ± 40.0 p ₁ < 0.001 + 86%	904.0 ± 53.2 p ₂ < 0.001 - 31%
Митохондрии	281.0 ± 22.0	300.0 ± 21.0 + 7%	528.0 ± 21.0 p ₁ < 0.001 + 76%	308.0 ± 11.0 p ₂ < 0.001 - 42%

*достоверность по сравнению с контролем, p < 0.05;

** достоверность по сравнению с *in vivo* ПБП-1, p₁ < 0.005;

*** достоверность по сравнению с *in vivo* коразола, p₂ < 0.01

Анализ характера распределения изучаемых фосфомоноэстераз по субклеточным фракциям показал, что, несмотря на различия в общей величине активности, субклеточная локализация их в целом носит сходный характер. Как видно из таблицы, активность ферментов цитоплазматических фракций на несколько порядков выше митохондриальной. Данный факт особенно наглядно проявляется у ЩФ. Обнаруженный факт не случаен, ибо, согласно литературным данным, ЩФ и КФ считаются лизосомальными ферментами.

На разработанных нами моделях крыс с эпилепсией, как видно из данных таблицы, в гомогенате печеночной ткани фиксируется заметное увеличение каталитической активности обеих фосфатаз. В то же время, при сравнении с показателями интактных животных, наблюдается неоднозначная чувствительность фосфомоноэстераз к коразолу. Если ЩФ гомогената увеличивается под воздействием данного препарата на 40%, то активация КФ вырисовывается значительно нагляднее и составляет более 90%. Схожая картина повторяется и при субклеточном распределении: активность КФ митохондриальной фракции больных крыс почти в 2 раза превосходит активность ЩФ. Подобный факт явно свидетельствует о нарушении функции митохондрий данного органа и говорит о наличии интоксикации. В последние годы значительно расширились знания относительно роли митохондриальных нарушений в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. В этом плане немаловажная роль уделяется КФ [13].

Особого внимания заслуживает факт достоверного понижения ферментативной активности фосфатаз у больных крыс после инъекции нейропептида. Как явствует из таблицы, ПБП-1 обладает способностью ингибировать КФ значительно сильнее нежели ЩФ. При всех случаях под влиянием пептида действие коразола существенно ослабевает, наблюдается тенденция к выравниванию каталитической активности в сторону здоровых животных. Последнее свидетельствует о том, что ПБП-1 участвует в процессе нейродегенерации и по мере возможности защищает нейроны от повреждения, стараясь восстановить гомеостаз клетки.

Совокупность полученных нами данных указывает на существование сложного молекулярного механизма клеточной регуляции нейропептидом. В то же время в имеющейся литературе полностью отсутствуют сведения о роли нейропептида ПБП-1 в углеводно-фосфорном обмене. И потому механизмы и факторы, регулирующие данный процесс в клетке, нам не совсем ясны и требуют изучения. Тем не менее одной из вероятных версий при данной патологии можно считать то обстоятельство, что при нарушении физико-химических свойств мембран, в которых расположены ЩФ и КФ, имеет место нарушение системы фосфорилирование-дефосфорилирование, в результате чего наступает сдвиг динамического равновесия между нервной и иммунной системами. Присутствие ПБП-1 в данной системе лимитирует степень участия фосфатаз в нейрохимическом обеспечении процессов дефосфорилирования, тем самым препятствуя нарастанию процессов катаболизма, создает условия для стабилизации конформации молекулы белка. Восстановив компенсаторные механизмы клетки, ПБП-1 снимает мембранотоксическое воздействие коразола и создает условия для функционирования нейромедиаторных систем ЦНС.

Поступила 07.06.16

**Հիպոթալամուսի ՊՀՊ-1-ի դերը հիմնային և թթու
ֆոսֆատազների ակտիվության կարգավորման մեխանիզմի մեջ
առնետների մոտ կոռագոլով մակաձված էպիլեպսիայի դեպքում**

**Լ.Պ. Տեր-Թադևոսյան, Լ.Ն. Առաքելյան, Ա.Ս. Մարգարյան, Ռ.Բ.
Բադալյան, Ա.Ա. Միմոնյան, Ս.Գ. Չաիլյան**

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի ՊՀՊ-1-ի ազդեցությունը ֆոսֆորային փոխանակության ֆերմենտների (հիմնային և թթու ֆոսֆատազներ) ակտիվության վրա կոռագոլով մակաձված առնետների լյարդի հյուսվածքում: Յույց է տրվել, որ ինտակտ կենդանիների մոտ *in vivo* պայմաններում նեյրոպեպտիդը միանման ազդեցություն չի ունենում ուսումնասիրվող ֆոսֆոմոնոէսթերազների վրա. հիմնային ֆոսֆատազը ցուցաբերում է ռեզիստենտություն այդ կենսախթանիչի նկատմամբ, իսկ թթու ֆոսֆատազի ակտիվությունն աճում է 30%-ով: Միաժամանակ, 8 մգ կորագոլի ներարկումը առնետներին 100 գ կենդանի քաշի հաշվով փոխում է պատկերն՝ խթանելով թթու և, համեմատաբար ավելի քիչ, հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը:

ՊՀՊ-1-ի ազդեցությունը կոռագոլով մակաձված խմբի կենդանիների ֆոսֆատազների ակտիվության վրա ակնայտ էր թթու ֆոսֆատազի դեպքում. 1γ կոնցենտրացիայով պեպտիդը զգալիորեն ճնշում է այդ ֆերմենտի ակտիվությունը, իսկ հիմնային ֆոսֆատազի վրա ՊՀՊ-1-ը ունենում է ավելի թույլ ազդեցություն: Նման պատկեր է դիտվում նաև էպիլեպտիկ առնետների ենթաբջջային ֆրակցիաներում. Պեպտիդն ավելի ակտիվ ազդեցություն է ունենում միտոքոնդրիալ և, ավելի քիչ՝ ցիտոպլազմատիկ թթու ֆոսֆատազի վրա:

Այսպիսով հետազոտվող նեյրոպեպտիդ ՊՀՊ-1-ը *in vivo* պայմաններում առավելագույնս չեզոքացնում է կոռագոլի խթանող ազդեցությունը, իջեցնելով թթու և, համեմատաբար ավելի քիչ՝ հիմնային ֆոսֆատազների մակարդակը՝ մոտեցնելով դրանք ստուգիչի արժեքներին:

**The role of hypothalamic PRP-1 in the mechanism of regulation of
the alkaline and acid phosphatases activities in rats with
corazol-induced epilepsy**

**L.P. Ter-Tadevosyan, L.N. Arakelyan, A.S. Margaryan, R.B. Badalyan,
A.A. Simonyan, S.G. Chailyan**

The influence of hypothalamic PRP-1 on the activity of phosphorus metabolism enzymes (alkaline and acid phosphatases) in the liver tissue of

corazol-induced rats was investigated. It was found out that the investigated phosphomonoesterases of intact animals *in vivo* conditions are not equally responsive to neuropeptide: alkaline phosphatase exhibits resistance to this biostimulator, acid phosphatase activates by 30%. In the same time, corazol, which was injected to rats in concentration 8 mg per 100 g in order, changed the picture by activating the acid and less alkaline phosphatase.

The influence of PRP-1 on the activity of phosphatases in corazol-induced animals was evident for acid phosphatase – peptide concentration in 1γ strongly inhibited the activity of this enzyme, the alkaline phosphatase reaction to the PRP-1 was weaker. The similar pattern was observed in the subcellular fractions of epileptic rats: the peptide activated the reactions of mitochondrial and slightly smaller – cytoplasmatic acid phosphatases.

Thus *in vivo* conditions PRP-1 maximally decreases the activating effect of corazol and the levels of acid and, slightly weaker, alkaline phosphatases, bringing them to control values.

Литература

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
2. Калусев А.В., Филоненко М.А., Громов Л.А. Нейромедиаторные механизмы действия коразола. Физиол. журн., 2000, т. 46, 4, с. 80-87.
3. Тер-Татевосян Л.П., Аракелян Л.Н., Ераносян Л.А., Галоян А.А. Изменения активности щелочной фосфатазы и неорганической пирофосфатазы в разных органах белых крыс под влиянием Галармина. Материалы конференции “Физиологические механизмы регуляции деятельности организма” НАН РА, 2012, с. 321-325.
4. Шлыгин Г.К., Михлин С.Я. Вопросы мед. химии, 1955, т. 1, с. 461-465.
5. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. Antibacterial activity of novel hypothalamic polypeptide. Dokl. NAS RA, 1999, Vol. 99, p. 367-371.
6. Davie M.W., Worsfold M., Sharp C.A. Differential response of serum alkaline phosphatase and serum osteocalcin in Paget's osteosarcoma. Ann. Clin. Biochem., 1991, Vol. 28, p. 194-195.
7. Davtyan T.K., Manukyan H.M., Hakopyan G.S. et. al. Hypothalamic proline-rich polypeptide is an oxidative urst regulator. Neurochem. Res., 2005, Vol. 30, 3, p. 297-309.
8. Fishman W.H. Recent developments in alkaline phosphatase research. Clin. Chem., 1992, Vol. 38 (12), p. 2484.
9. Galoyan A.A. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus – Endocrine Heart. Nauka publisher, Moscow, 1997.
10. Galoyan A.A., Shakhlamov V.A., Aghajanov M.I. et. al. Hypothalamic proline rich polypeptide protects brain neurons in aluminum toxicosis. Neurochem. Res., 2004, Vol. 29, 7, p. 1349-1357.
11. Hammond K.D., Mohammed E., Gregor R.T. Alkaline Phosphatase and Phosphoamino Acid Phosphatases in Normal and Cancerous Tissues of the Human Laryngs. Biochem. Metab. Biol., 1990, Vol. 43 (1), p. 75-79.
12. Johnson N.L. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. FAS EB. J., 1992, Vol. 6, p. 2274-2282.
13. Morgen J.I., Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci., 1998, Vol. 12, p. 459-462.

14. *Racine R.J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 1972, Vol. 32. p. 281–294.
15. *Ter-Tatevosyan L.P., Sarkisyan L.V., Yerosyn L.A. et al.* Enzymes of Carbohydrate-Phosphorus Metabolism in the Bone Marrow and Spleen after Sympathectomy. Effect of Neuropeptide PRP-1. *Neurochemical Journal*, 2009, Vol. 3 (4), p. 301-304.
16. *Yerosyan L.A., Ter-Tatevosyan L.P., Galoyan A.A.* New data about the existence of hypothalamus-bone marrow neurohumoral axis. Participation of NPV in regulation of carbohydrate phosphorus metabolism in bone marrow and spleen. *FEBS 11th Young Scientist Forum*, Yerevan, 2011, p. 42.