

БИОХИМИЯ

УДК 577.15

Л. П. Тер-Татевосян, Л. В. Саркисян, И. Г. Асланян, академик А. А. Галоян

**Воздействие PRP-1 на активность некоторых фосфатаз костного мозга
белых крыс, пораженных циклофосфамидом**

(Представлено 19/XI 2007)

Ключевые слова: *щелочная фосфатаза, кислая фосфатаза, неорганическая пирофосфатаза, гликогенфосфорилаза, PRP-1, циклофосфамид*

Первичным местом гематопоеза является костный мозг — место рождения всех клеток иммунной системы и созревания В-лимфоцитов. Кроветворная стволовая клетка, являющаяся родоначальницей всех клеток иммунной системы, обеспечивает восстановление поврежденных участков органов и тканей. Регулирует функции иммунитета и защитные реакции гипоталамо-гипофизокортикотропная система. Пептидные гормоны, вырабатываемые в гипоталамусе и поступающие из него в гипофиз, служат связывающим звеном между нервной и эндокринными системами, играют важную роль в регуляции и реализации многих функций организма. Иммуностимулирующие пролин-богатые пептиды, выделенные А.А.Галояном и сотр. из гипоталамуса быка, участвуют в регуляции физиологических функций, связанных с деятельностью центральной и периферической нервной системы [1-3].

Согласно нашим данным некоторые биоактивные пептиды оказывают определенное воздействие на ряд ферментов углеводно-фосфорного обмена [4, 5]. Фосфатазы — ферменты, катализирующие разрыв сложноэфирной связи в моноэфирах фосфорной кислоты с образованием свободного фосфата, относятся к классу гидролаз. Вместе с протеинкиназами они принимают равное участие в поддержании динамического равновесия и функциональной готовности ферментных и других фосфопротеинов, необходимых для обеспечения клеточного гомеостаза. Известен ряд заболеваний и патологических состояний, в основе которых лежит недостаточность тех или иных ферментов.

Определение активности многих фосфатаз в биологических жидкостях и тканях играет значительную роль в лабораторной диагностике различных заболеваний (туберкулез, лимфогрануломатоз, амилоидоз, рак предстательной железы, гликогенолиз, болезнь Херса), а также служит показателем эффективности лечения этих болезней [6-9].

Задачей данного исследования явилось изучение роли и механизма действия пролин-богатого гипоталамического нейропептида PRP-1 (галармина) на ферментативную активность щелочной и кислой фосфатаз, неорганической пирофосфатазы, гликогенфосфорилазы у здоровых животных, а также при некоторых патологических состояниях (изменениях в организме), вызванных циклофосфамидом (ЦФА).

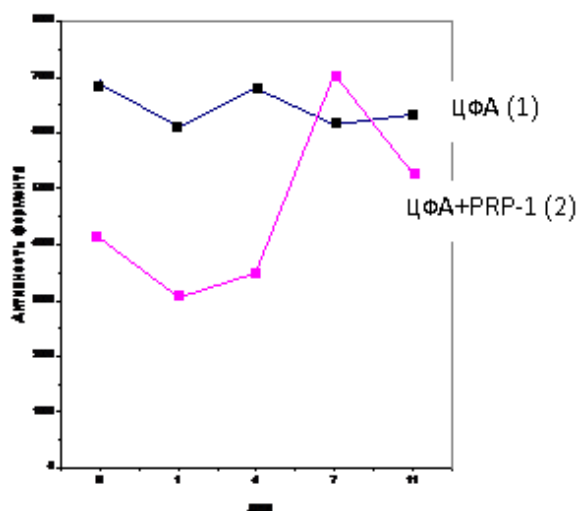
Методика. Опыты выполнены на 60 самцах беспородных крыс. Первой группе крыс (25 животных массой 125 г) вводили внутривентриально ЦФА в физрастворе в дозе 6 мг. Второй группе (25 животных массой 220 г) вводили внутривентриально ЦФА в физрастворе в дозе 10 мг. Через час им же вводили PRP-1 в дозе 20 γ . Контрольной группе (10 крыс) вводили равное количество физраствора. Декапитировали крыс в 1-й, 4-й, 7-й и 11-й дни. Извлекали костный мозг из бедра и готовили гомогенат в физрастворе в соотношении 1:50 (вес:объем). В эксперименте были использованы коммерческие очищенные ферменты: щелочная фосфатаза из кишечника коровы в разведении 1 мг в 20 мл дистиллированной воды и гликогенфосфорилаза а, выделенная из мышц кролика, в разведении 1 мг в 5 мл H₂O.

Активность щелочной фосфатазы (коэф. фермента 3.1.3.1) и кислой фосфатазы (коэф. фермента 3.1.3.2) определяли методом Шлыгина и Михлина [10]. В качестве субстрата использовали пара-нитрофенилфосфат ("Serva") в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М в медиановом буфере с рН 9.6 для щелочной фосфатазы и рН 4.6 для кислой. Об активности этих ферментов судили по нарастанию паранитрофенола в течение 30 мин при 30°C. Активность неорганической пирофосфатазы (коэф. фермента 3.6.1.1) определяли методом Геппеля [11]. Субстратом для данного фермента служил неорганический пирофосфат Na в медиановом буфере с рН 7.2. Активность фермента определяли по нарастанию неорганического фосфора.

Активность гликогенфосфорилазы (коэф. фермента 2.4.6.1) определяли по Иллингворту и Кори [12]. Исследованный материал прединкубировали 2 мин при 30°C с 0.1 мл 4% водного раствора гликогена, 0,1 мл ТЭМ буфера, 0,1 мл исследуемого пептида и далее для хода опыта добавляли 0.1 мл 64 мМ глюкозо-1 фосфата. Через 5 мин реакцию приостанавливали 1.6 мл охлажденной 5% ТХУ. Активность фермента определяли по убыли

неорганического фосфора в реакционной смеси.

Влияние гормонов на обмен веществ и энергии осуществляется в основном через изменение активности определенных ферментов, причем гормоны влияют либо непосредственно на их синтез, либо на синтез других веществ, участвующих в конкретном ферментативном процессе.

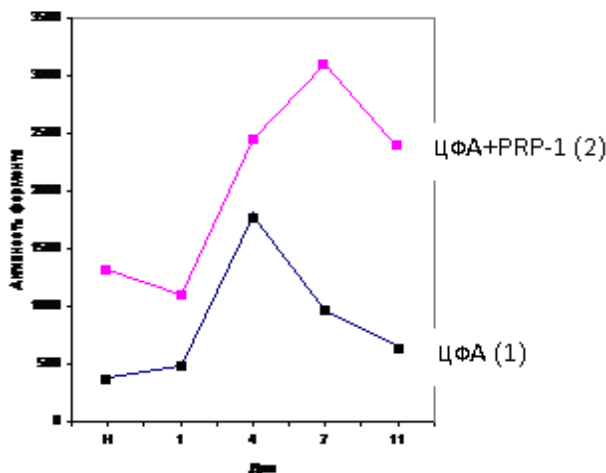


$$\text{Щелочная фосфатаза } E = \frac{\text{мкМ фенола}}{\text{г тк. мин.}}$$

Рис. 1. Влияние ЦФА и PRP-1 на активность щелочной фосфатазы костного мозга крыс (in vivo): 1 – крысы весом 125 г (доза ЦФА 6 мг.); 2 – крысы весом 220 г (доза ЦФА 10 мг, PRP-1 20 мкг).

В зависимости от источника энзима, условий среды инкубирования, концентрации используемых соединений обнаруживается как их активирующий эффект, так и ингибирующий. Щелочная фосфатаза (ЩФ) считается одним из наиболее распространенных ферментов органического мира с самыми различными проявлениями активности, зависящими от локализации в различных органах и клеточных структурах. На ранних этапах наших исследований ЩФ обнаружена в гомогенате костного мозга крысы, а также установлен факт регулирующего действия на активность данного фермента одного из гипоталамических нейропептидов – галармина. Изменения в свойствах ЩФ в этой ткани наблюдались нами также при функциональных и патологических состояниях организма (раздражение, передозировка). С целью изучения характера возможных изменений активности ЩФ под действием пептида PRP-1 нами проведены две серии опытов (in vivo): 1) с однократной инъекцией ЦФА, 2) с инъекцией ЦФА и PRP-1 (рис.1). Кривые графика показывают, что введение ЦФА на активность исследуемого фермента существенного воздействия не оказывает: понижение активности

от 2 до 12% регистрируется в 1-й, 4-й и 11-й дни. На 7-й день после введения ЦФА активность щелочной фосфатазы подавляется несколько сильнее, доходя до 24% от контрольной величины.

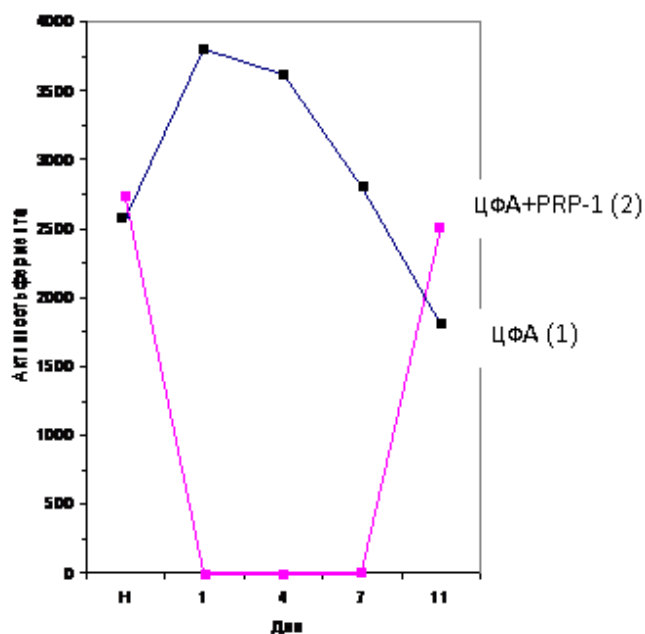


$$\text{Кислая фосфатаза } E = \frac{\text{мкМ фенола}}{\text{Г ТК. МИН.}}$$

Рис. 2. Влияние ЦФА и PRP-1 на активность кислой фосфатазы костного мозга крыс (in vivo): 1 – крысы весом 125 г (доза ЦФА 6 мг.); 2 – крысы весом 220 г (доза ЦФА 10 мг, PRP-1 20 мкг).

Вторая группа животных, которой дополнительно введен PRP-1, неоднозначно реагирует на действие этих эффекторов: спад активности ЩФ, по сравнению с фоновой, наблюдаемый в 1-й и 4-й дни, скачкообразно переходит в процесс активации на 7-й день (+50%), затем слегка понижается на 11-й день (+29%), оставаясь выше фоновой. При действии этих двух реагентов на очищенный фермент была получена умеренная активация ЩФ при всех используемых дозах ЦФА и PRP-1. Выявленные в опытах на чистом ферменте результаты не повторились на гомогенате в опытах in vitro, где ЩФ проявила полную резистентность к данным веществам. Из вышеприведенных данных следует, что характер действия PRP-1 (на фоне ЦФА) на ЩФ живого организма и на чистый фермент неодинаков. Очевидно, в обоих случаях неоднозначная реакция фермента на эти реагенты должна рассматриваться с точки зрения структурных особенностей ЩФ в данной среде. ЩФ, являясь металлопротеином [13], регулируется специфическими и неспецифическими активаторами и ингибиторами. Избирательность их действия объясняется тем, что они реагируют со строго определенной химической группировкой в активном центре фермента (Zn^{2+} , Mg^{2+}), в результате чего имеет место конформационная перестройка молекулы, которая создает определенные условия для фермент-субстратного комплекса. А возможно, эти различия связаны с существованием в исследуемой ткани нескольких каталитически

активных молекулярных форм ЩФ, с частично перекрывающимися, но не совпадающими свойствами, служащих для гибкой и избирательной регуляции различных клеточных процессов [14].

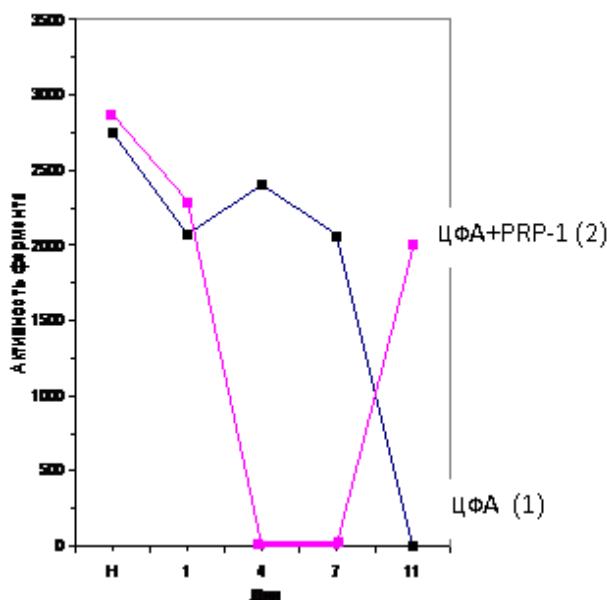


$$\text{Неорганическая пирофосфатаза } E = \frac{\text{мкМ фенола}}{\text{г тк. мин.}}$$

Рис. 3. Влияние ЦФА и PRP-1 на активность неорганической пирофосфатазы костного мозга крыс (in vivo): 1 — крысы весом 125 г (доза ЦФА 6 мг.); 2 — крысы весом 220 г (доза ЦФА 10 мг, PRP-1 20 мкг).

Кислая фосфатаза (КФ) катализирует гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты и органических соединений. Этот лизосомальный фермент содержится практически во всех тканях. Высокая концентрация ее отмечается в эритроцитах, тромбоцитах, костном мозге и др. Подобно ЩФ КФ является фенотипическим маркером для дифференциации ряда заболеваний [6, 15]. Особого внимания заслуживают данные, полученные при исследовании КФ костного мозга — ткани, в которой сконцентрировано наибольшее количество кроветворных клеток (рис. 2). Если проследить за активностью данного фермента в динамике, то, согласно кривой (у 3-месячных крыс) ЦФА выступает активатором КФ, причем по сравнению с контролем наивысший пик приходится на 4-е сутки после инъекции (+366%). Введение крысам второй группы (9-месячные) 20γ PRP-1 на фоне ЦФА значительно нормализует картину: PRP снимает активирующий эффект ЦФА, максимально приближая эту величину к контрольной. Аналогичные данные, полученные нами ранее при раздражении гипоталамических ядер мозга крысы, где регистрировалась также резкая активация КФ, однозначно указывают на разрушительный

характер ЦФА и защитный эффект нейропептида. Эффект действия PRP-1, по-видимому, обусловлен образованием большого количества активных радикалов, которые могут привести к блокированию активности не только фермента, но и веществ, ответственных за образование фермент-субстратного комплекса. Возможно, в механизме действия данного пептида на ферментативную активность КФ существуют и другие пути.



$$\text{Гликогенфосфорилаза } E = \frac{\text{мкМ фенола}}{\text{г тк. мин.}}$$

Рис. 4. Влияние ЦФА и PRP-1 на активность гликогенфосфорилазы костного мозга крыс (in vivo): 1 — крысы весом 125 г (доза ЦФА 6 мг.); 2 — крысы весом 220 г (доза ЦФА 10 мг, PRP-1 20 мкг).

Неорганические пирофосфаты, простейшие накопители энергии в живых клетках, расщепляются неорганической пирофосфатазой. Этот фермент участвует в ряде биохимических процессов на разных стадиях эволюции фосфорного обмена.

Исследования неорганической пирофосфатазы (рис. 3) показали, что ЦФА действует активирующе на фермент, плавно понижая его активность до 7-го дня, и на 11-й день регистрируется резкий спад ферментативной активности (– 30%). PRP-1, введенный животным через час после ЦФА, глобально меняет картину. Активность фермента существенно подавляется, доходя до нуля на 7-й день, затем пептид стимулирует процесс активации фермента, доводя его почти до нормы (11-й день), что по сравнению с фоновой составляет 60%. Рядом исследователей показано, что при воздействии на неорганическую пирофосфатазу некоторых тканей, в том числе и эритроцитов, веществами, блокирующими сульфгидрильные группы, угнетается ее активность [16]. Роль же PRP-1, вероятно, сводится к

связыванию ионов двухвалентных металлов, что приводит к спаду ферментативной активности неорганической пирофосфатазы.

Действие PRP-1 на активность фосфатаз, очищенных из тканей животных, на фоне циклофосамида (ЦФА);

$$1 - E = \frac{\text{мкМ фенола}}{\text{мг белка мин}}, \quad 2 - E = \frac{\text{мкМ Р}}{\text{мг белка мин}}$$

	Ферменты	Норма	PRP-1 0.01γ	ЦФА 100 γ		ЦФА 50 γ		ЦФА 20 γ	
				-	+ PRP-1	-	+ PRP-1	-	+ PRP-1
1	Щелочная фосфатаза (из слизистой кишок коровы)	3500 100%	5600 +60%	3980 +13%	3897 +11%	3745 +7%	3801 +8%	3502 0	4580 +31%
2	Гликогенфосфоорилаза (из мышц кролика)	1520 100%	2734 +80%	2124 +140%	4566 +200%	3042 +100%	4563 +200%	2432 +60%	3039 +100%

Гликогенфосфоорилаза (ГФ) катализирует последовательное отщепление гликозильных остатков с нередуцирующего конца α-1,4 гликозильной цепи гликогена с высвобождением глюкозы-1-Р. Фермент существует в активной (а) и неактивной (б) формах. Гормональная регуляция ГФ осуществляется не прямо, а через каскадную систему усиления сигналов, включающих соответствующие протеинкиназы и фосфатазы [17]. Последние являются ключевыми ферментами клеточного метаболизма, фосфорилирование-дефосфорилирование которых приводит к оперативной модификации их функций и последующим физиологическим ответам. Кривая, представленная на рис.4, свидетельствует о том, что ЦФА в опытах *in vivo* для ГФ костного мозга выступает ингибитором; развивающееся поражение организма приводит к значительному спаду ферментативной активности в более поздние сроки (к 11-му дню), где ГФ показывает нулевую величину. Другая группа животных, которой вместе с ЦФА введен PRP-1, реагирует однотипно с группой, получившей ЦФА. PRP-1 не только снимает ингибирующий эффект ЦФА, но и доводит активность энзима до нуля на 4-е и 7-е сутки. В итоге под действием обоих веществ в активности ГФ наблюдается сдвиг метаболических процессов от анаболизма к катаболизму. Для выявления характера действия PRP-1 на ГФ была поставлена серия опытов на очищенном ферменте. В литературе существуют разногласия относительно механизма регуляции

чистых ферментов, ферментов в гомогенате и ферментов организма. При гомогенизировании тканей происходит ряд изменений в структуре клеток, при этом нарушается их целостность, что может резко повлиять на полученные данные и вызвать ряд изменений с ферментом. Таблица демонстрирует максимальную активацию ГФА после добавления в инкубационную среду определенных доз ЦФА и PRP-1. Кажущийся парадоксальным факт мощного активирования ГФА на чистом ферменте под действием этих же реагентов можно объяснить следующим образом. Если фермент находится в системе, то активирующие и ингибирующие реагенты не проявляют своего действия полностью, поскольку фермент защищен внутренними регуляторами, предохраняя его от внешних воздействий. На очищенный фермент активаторы и ингибиторы оказывают полное действие в результате освобождения от внутренних регуляторов. Тканевая ГФ контролируется соответствующими протеинкиназами и протеинфосфатазами, которые в свою очередь регулируются низкомолекулярными лигандами, регуляторными белками и нейрогуморальными факторами. Поэтому многие нарушения процесса ферментативной деградации и синтеза гликогена могут быть обусловлены не только нарушениями биосинтеза ГФ и гликогенсинтазы, но и ряда белков, участвующих в их регуляции.

Полученные нами сведения об изменении активности фосфатаз при патологических состояниях организма и регулирующем эффекте PRP-1 в процессах дефосфорилирования представляют интерес, с учетом важного значения этих ферментов в клинической биохимии.

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА

Л. П. Тер-Татевосян, Л. В. Саркисян, И. Г. Асланян, академик А. А. Галоян

Воздействие PRP-1 на активность некоторых фосфатаз костного мозга белых крыс, пораженных циклофосфамидом

Изучалось влияние пролин-богатого нейропептида PRP-1 на активность щелочной и кислой фосфатаз (ЩФ и КФ), пирофосфатазы (ПФ), а также гликогенфосфорилазы (ГФ) в гомогенатах костного мозга крыс, пораженных циклофосфамидом (ЦФА) в условиях *in vivo* и *in vitro*. Данные, полученные в экспериментах, показали неоднозначное действие PRP-1 на активность исследуемых ферментов как в норме, так и у крыс, инъецированных ЦФА в процессе динамики (1, 4, 7, 11 дни). В дозе 20 γ (на животное) пептид подавляет активность ЩФ, ПФ и ГФ у крыс с ЦФА. В то же

время активность КФ, повышенная в три раза после введения ЦФА, под действием пептида PRP-1 нормализуется, доходя до контрольной величины. Для очищенных ферментов (ЩФ, КФ и ГФ) эти оба реагента во всех используемых дозах выступают активаторами. Данные, полученные на чистых ферментах, не повторились в опытах *in vitro* на гомогенатах ткани костного мозга, где все четыре фермента проявили полную резистентность к ЦФА и PRP-1.

Результаты опытов говорят о том, что пептид PRP-1 обладает регулирующим действием для ферментов — фосфатаз костного мозга как у нормальных, так и у крыс с патологией.

Լ. Պ. Տեր-Թադևոսյան, Լ. Վ. Սարգսյան, Ի. Գ. Ասլանյան, ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան

PRP-1-ի ազդեցությունը ցիկլոֆոսֆամիդով վնասված սպիտակ առնեւրների ոսկրածուծի որոշ ֆոսֆատազների ակտիվության վրա

Ուսումնասիրվել է պրոլիներով հարուստ նեյրոպեպտիդ PRP-1-ի ազդեցությունը հիմնային եւ թթու ֆոսֆատազների (ՆՖ եւ ԹՖ), անօրգանական պիրոֆոսֆատազի, ինչպես նաեւ գլիկոզեն ֆոսֆորիլազի ակտիվության վրա՝ ցիկլոֆոսֆամիդով (ՅՖ) վնասված առնեւրների ոսկրածուծի հոմոզենատում *in vivo* եւ *in vitro* պայմաններում: Յույց է տրվել, որ PRP-1-ը ունի ոչ միանման ազդեցություն ուսումնասիրվող ֆերմենտների ակտիվության վրա. այդ պեպտիդը ճնշում է գլիկոզեն ֆոսֆորիլազի եւ անօրգանական պիրոֆոսֆատազի ակտիվությունը ՅՖ ներարկված առնեւրների մոտ: Նկատվում է նաեւ ՆՖ-ի ակտիվության արգելակում ՅՖ-ով, սակայն PRP-1-ի (*in vivo*) ներարկումից հետո 7- եւ 11-րդ օրերում տեղի է ունենում ռեակցիայի ստիմուլացում համապատասխանաբար 29 եւ 72%-ով: Նեյրոպեպտիդի ամենամեծ ազդեցությունը նկատվում է ԹՖ-ի վրա, որտեղ ՅՖ-ն ֆերմենտի ակտիվությունը կտրուկ բարձրացնում է 4-րդ օրը (+336%), իսկ PRP-1-ը հանդես է գալիս որպես ԹՖ-ի ակտիվության կարգավորիչ՝ նվազեցնելով այն մինչեւ նորմա: Մաքրված ֆերմենտի վրա այդ երկու ռեագենտների ազդեցության ժամանակ (ՆՖ եւ ԹՖ) գրանցվում է ՆՖ-ի չափավոր ակտիվություն ՅՖ-ի եւ PRP-1-ի օգտագործված բոլոր դեպքերում եւ, կարող է պարադոքսալին թվալ, տեղի է ունենում գլիկոզենֆոսֆորիլազա - a-ի մաքսիմալ ակտիվացում: Մաքուր ֆերմենտով կատարված փորձերի արդյունքում սրացված տվյալները չկրկնվեցին *in vitro* փորձերում, որտեղ ֆերմենտները տվյալ էֆեկտորների նկատմամբ դրսևորեցին ռեզիստենտություն:

Փորձերի արդյունքները վկայում են այն մասին, որ PRP-1 պեպտիդը ունի կարգավորիչ ազդեցություն առողջ եւ պաթոլոգիայով առնեւրների ոսկրածուծի ֆոսֆատազների վրա:

L. P. Ter-Tadevosyan, L. V. Sarkissyan, I. A. Aslanyan, academician A. A. Galoyan

Action of PRP-1 on the Activity of Some Phosphatases in Bone Marrow of White Rats Injured by Cyclophosphamide

Study of the action of proline-rich peptide PRP-1 on the activity of alkaline and acid phosphatases, inorganic pyrophosphatase, as well as the glycogenphosphorilase in bone marrow homogenates of injured with cyclophosphamide (CPA) rats in vivo and in vitro, demonstrated the significant influence of PRP-1 on the activity of enzymes investigated.

It was shown that PRP-1 exerts the different influence on the activity of the enzymes mentioned. Thus, the peptide inhibits the activity of glyco-genphosphorilase and inorganic pyrophosphatase in bone marrow of injured with CPA rats. Inhibition by CPA is also observed regarding the alkaline phosphatase, however, the dramatic changes in the inhibition of this enzyme activity occur in vivo in 7 and 11 days after the i/m administration of PRP-1.

The most effect of peptide influence is observed regarding the acid phosphatase activity when PRP-1 reduces the strongly activated by CPA enzyme activity (per 366

At the action of CPA and PRP-1 on the purified enzymes being under the investigation the moderate activation of alkaline phosphatase, and, paradoxically, of glycogenphosphorilase a, is registered with all doses of these two agents used.

The present results testify that under the normal and pathological conditions, PRP-1 possesses the regulatory properties on (for) the activity of the phosphatases studied in rat bone marrow.

Литература

1. *Galoyan A.* Neurosecretory hypothalamus - bone marrow neurohumoral axis: chemistry and biology of the mediators. 2-ISSMPS. 2006. Armenia-Germuk. 4-5.
2. *Galoyan A.A., Grigoryan S.L., Badalyan K.V.* - Neurochemical Research. 2006. V. 31. N 6. P. 795-803.
3. *Galoyan A.A.* Signal molecules of the brain neuroendocrine immune system against infection and tumor cells. Proceedings of the Int. conf. Advanced Biotechnology. Perspectives of Development in Armenia. Yerevan. 2006. 18 p.
4. *Тер-Татевосян Л.П., Саркисян С.В., Асланян И.Г., Галоян А.А.* - Доклады НАН Армении. 2004. Т. 104. N 4. С. 343-347.
5. *Тер-Татевосян Л.П., Саркисян Л.В., Асланян И.Г., Галоян А.А.* - Доклады НАН Армении. 2006. Т.106. N 4. С.349-354.
6. *Tarie M., Kovacic K., Strelkov-Alfirevic A.* - Prostate. 1989. V. 15. N 3. P. 211-219.
7. *Tokiva Takayoshi, Endo Akiro, Sato Jiron.* - Experim. cell. Biol. 1989. V. 57. N 6. P. 324-329.

8. *Davie M.W.I., Worsfold M., Shorp C.A.* - Ann. Cein. Biochem. 1991. V. 28. N 2. P. 194-195.
9. *Tsavaris N., Pangalis Gerassimos A., Kosmidis P., Konstantopoulos K., Variami E., Ganotakies M., Tsoutsos E., Dimitriadis G., Raptis S.* - Acta histochem. at cytochem. 1991. V. 24. N 3. P. 329-334.
10. *Шльгин Г.К., Михлин С.Я.* - Вопросы мед. химии. 1955. N 1. С. 461-465.
11. *Heppel L.A.* - Methoda in Enzynology. 421. N.-Y. 1955. V. 2. P. 570-574.
12. *Illingwort B.I., Cori C.T.* - Biochem., Preparations. 1953. V. 3. P.1-9.
13. *Petit C.C., Deliste M., Martel M., Fectean C., Brier N., Can. J.* - Biochem. 1975. V. 53. N 10. P. 1089-1100.
14. *Anderson David J., Branum Fare L., O'Brjen John F.* - Clin. Chem. 1990. V. 36. N 2. P. 240-248.
15. *Hammond K.D., Mohmed E., Gregor R.T.* - Biochem. Med. and Metab. Biol. 1990. V. 43. N 1. P. 75.
16. *Naganna B., Narayana K., Menon V.K.* - J. Biol. Chem. 1948. V. 174. N 2. P. 501.
17. *Sim A., Collins E., Mudge L.M.* - J. Neurochemistry. 1997. V. 69. P. 163.